



УДК 616-091.8

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ607446>

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СВЕТОВЫХ РЕЖИМОВ НА НЕКОТОРЫЕ ЦИРКАДНЫЕ РИТМЫ ТРАНСПЛАНТИРУЕМОЙ МЕЛАНОМЫ B16

Д.А. Арешидзе¹, М.А. Козлова¹, Д.В. Мищенко², В.П. Черников¹, Т.В. Безуглова¹, М.В. Мнихович¹,
З.В. Гиева¹, У.Ю. Аллаярова², А.И. Ануркина¹

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына
Российского научного центра хирургии им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия;

² Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии
Российской академии наук, Черноголовка, Россия

Для цитирования: Арешидзе Д.А., Козлова М.А., Мищенко Д.В., Черников В.П., Безуглова Т.В., Мнихович М.В., Гиева З.В., Аллаярова У.Ю., Ануркина А.И. Влияние различных световых режимов на некоторые циркадные ритмы трансплантируемой меланомы B16 // Медицинский академический журнал. 2023. Т. 23. № 4. С. 21–31. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ607446>

Рукопись получена: 11.10.2023

Рукопись одобрена: 12.12.2023

Опубликована: 27.04.2024

Обоснование. На сегодняшний день известно, что нарушение режима освещения, выражающееся как удлинением светового периода, так и его сокращением, не только может повлиять на регуляцию циркадных ритмов организма, но и способствует инициированию роста новообразований.

Цель — изучение циркадной ритмичности уровня мелатонина, некоторых микроморфометрических показателей клеток опухоли и экспрессии в них генов *Bmal1*, *Clock* и *Per2* у мышей с трансплантированной меланомой B16.

Материалы и методы. Исследование проведено на 75 мышах с трансплантируемой подкожно меланомой B16, разделенных на 3 группы: контрольную, в которой животных содержали при фиксированном световом режиме (свет/темнота 10/14 ч с включением света в 8:00 и выключением в 18:00); группу, находящуюся в условиях темновой депривации, с содержанием животных при постоянном освещении 24 ч/сут; группу, в которой животные пребывали в постоянной темноте. Длительность эксперимента составляла 2 нед.

Результаты. Показано, что в условиях фиксированного освещения достоверные циркадные ритмы присутствуют у всех изученных показателей, за исключением ядерно-цитоплазматического отношения, циркадных ритмов которого не выявлено ни в одной группе. Постоянная темнота приводит к перестройке всех выявленных ритмов, а постоянный свет вызывает разрушение всех циркадных ритмов, кроме ритма экспрессии *Clock*.

Закключение. Проведенное исследование показало, что нарушения режима освещения, будь то постоянное освещение или постоянная темнота, приводят к значительным изменениям в структуре изученных циркадных ритмов.

Ключевые слова: циркадный ритм; световое загрязнение; меланома; мелатонин; часовые гены.

INFLUENCE OF VARIOUS LIGHT REGIMES ON SOME CIRCADIAN RHYTHMS OF TRANSPLANTABLE MELANOMA B16

David A. Areshidze¹, Maria A. Kozlova¹, Denis V. Mishchenko², Valery P. Chernikov¹, Tatiana V. Bezuglova¹, Maxim V. Mnikhovich¹, Zarina V. Gioeva¹, Uguljan Yu. Allayarova², Anna I. Anurkina¹

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia;

² Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

For citation: Areshidze DA, Kozlova MA, Mishchenko DV, Chernikov VP, Bezuglova TV, Mnikhovich MV, Gioeva ZV, Allayarova UYu, Anurkina AI. Influence of various light regimes on some circadian rhythms of transplantable melanoma B16. *Medical Academic Journal*. 2023;23(4):21–31. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ607446>

Received: 11.10.2023

Accepted: 12.12.2023

Published: 27.04.2024

BACKGROUND: Today it is known that disturbance of the lighting regime, expressed both by lengthening of the light period and its reduction, can not only affect the regulation of circadian rhythms of the organism, but also contributes to the initiation of neoplasm growth.

AIM: The aim of the study was to investigate circadian rhythmicity of melatonin level, some micromorphometric indices of tumor cells and expression of genes *Bmal1*, *Clock* and *Per2* in them in mice with transplanted melanoma B16.

Список сокращений

ЦР — циркадные ритмы; ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение.

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted on 75 mice with subcutaneously transplanted melanoma B16, divided into 3 groups: control group, in which animals were kept under fixed light regime (light/darkness 10/14 hours with light on at 8:00 and off at 18:00), group under dark deprivation conditions, with animals kept under constant light 24 hours a day and group, in which animals were kept in constant darkness. The duration of the experiment was 2 weeks.

RESULTS: It was shown that under conditions of fixed light there are reliable circadian rhythms for all studied parameters, except for the nuclear-cytoplasmic ratio, the circadian rhythms of which was not revealed in any group. Constant darkness leads to rearrangement of all identified rhythms, and constant light causes destruction of all circadian rhythms except the Clock expression rhythm.

CONCLUSIONS: This study shows that light disturbances, whether constant light or constant darkness, lead to significant changes in the structure of the studied circadian rhythms.

Keywords: circadian rhythm; light pollution; melanoma; melatonin; clock genes.

Обоснование

Циркадная система организма млекопитающих представляет собой сложный механизм, который, контролируя экспрессию генов и различные метаболические пути, регулирует многие циклические физиологические процессы. Циркадные ритмы (ЦР) функций и процессов в организме, характеризующиеся различными амплитудно-фазовыми характеристиками, в норме строго синхронизированы между собой и с факторами внешней среды. Такая координация обеспечивает необходимый порядок в ходе этих процессов и позволяет поддерживать оптимальный уровень функционирования систем организма [1, 2].

Ряд исследований показывает связь между нарушением нормального ЦР и инициацией роста злокачественных опухолей [3, 4].

Суточная ритмичность в клетках различных органов млекопитающих поддерживается за счет колебаний экспрессии часовых генов. В то же время известно, что многие гены-супрессоры опухолей, а также гены, регулирующие клеточный цикл и апоптоз, находятся под контролем циркадных часов [5]. Исследования R. Zhou и соавт. [6] показали, что ЦР множества скрининговых биомаркеров могут выступать в качестве прогностического фактора для оценки общей выживаемости при раке молочной железы.

Показано также, что эпидермис мышей более чувствителен к индуцированному повреждению ДНК ультрафиолетовым излучением типа В в ночное время [7, 8], применение которого в ночное время приводит к более выраженному канцерогенезу в коже, чем дневное применение [9]. Эти суточные различия стираются в случае мутации в основных часовых генах *Bmal1* и *Cry1/Cry2*, что свидетельствует о контроле изменчивости чувствительности циркадными часами. Механизмы этого явления могут лежать в области часовой периодичности варибельности репарации ДНК, которая менее эффективна в ночное время, или быть следствием увеличения доли эпидермальных стволовых клеток в S-фазе в ночное время [10].

Имеются данные, что при новообразованиях нарушаются суточная ритмичность экспрессии

генов и функционирование «клеточных часов» в опухолевых клетках [11, 12].

Основной фактор, вызывающий дезорганизацию биоритмов в современном мире в настоящее время, — нарушение соотношения продолжительности светлого и темного периодов индивидуального дня человека; частным случаем такого нарушения является световое загрязнение — воздействие света в ночное время [13]. Это явление среды практически неизбежно для современного горожанина в силу таких социальных причин, как высокая степень цифровизации всех трудовых и повседневных процессов, значительная интенсивность уличного освещения, сменная или сверхурочная работа, частые трансмеридианные перелеты, провоцирующие десинхроноз при смене часовых поясов, и т. д. [14]. В соответствии с гипотезой «циркадианной деструкции», которой придерживается большинство хронобиологов, воздействие света в ночное время приводит к нарушению эндогенной циркадной ритмичности, а также подавляет ночную секрецию мелатонина шишковидной железой [15].

По данным различных исследований, лишение организма темноты в ночное время суток связано со спонтанным онкогенезом у некоторых млекопитающих [16, 17]. Известно, что постоянное освещение наряду с другими механизмами может активировать развитие химически индуцированного онкогенеза у модельных животных, а также способствовать росту перевиваемых опухолей [18, 19].

В наших предыдущих исследованиях мы показали, что длительное воздействие постоянного освещения провоцирует усиление пролиферации клеток меланомы, вызывает более значительный рост и распространение этой опухоли, индуцирует развитие более выраженных вторичных изменений, чем у контрольных животных, приводит к периваскулярному росту и увеличению периневральной инвазии. При этом длительное содержание животных в условиях постоянной темноты приводит к значительному снижению интенсивности пролиферации опухолевых клеток, к значительной регрессии опухоли при

отсутствии признаков лимфо-, внутрисосудистой и интраневральной инвазии. Эти различия в морфологических характеристиках опухоли подтверждены результатами микроморфометрического исследования ее клеток. Результаты наших предыдущих опытов также показали значительное подавление экспрессии часовых генов в клетках меланомы под действием постоянного освещения, а под влиянием постоянной темноты, напротив, она повышалась [20, 21].

Целью исследования было выявление и анализ суточной динамики и циркадной ритмичности уровня мелатонина в крови, экспрессии генов *Per2*, *Bmal1* и *Clock* в клетках опухоли и некоторых микроморфометрических показателей данных клеток у мышей при перевиваемой меланоме B16.

Материалы и методы

В исследовании были использованы мышамцы гибридной линии BDF1 в возрасте 8 нед. ($n = 75$), массой тела 21–22 г. Содержание животных в виварии и все экспериментальные воздействия были стандартными и осуществлялись в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Серия исследований, к которой относится данный этап эксперимента, одобрена Биоэтическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына».

В исследовании были использованы три равные группы мышей.

Животных контрольной группы ($n = 25$) содержали в условиях режима фиксированной смены света и темноты с использованием искусственного освещения люминесцентными лампами (10/14 ч, свет включали в 8:00 и выключали в 18:00).

I опытную группу ($n = 25$) содержали в условиях постоянного освещения.

II опытную группу ($n = 25$) содержали в условиях постоянной темноты.

Образцы культуры клеток меланомы B16/F10 вводили каждому животному по стандартной методике [22]. Убой животных методом дислокации шейного позвонка проводили на 15-е сутки после трансплантации меланомы. Животных выводили из эксперимента «методом временных срезов» 4 раза в сутки (9:00, 15:00, 21:00 и 03:00) для каждой группы по 6–7 животных в каждую временную точку, затем производили эвисцерацию.

Образцы меланомы фиксировали в 10 % нейтральном забуференном формалине и обрабаты-

вали стандартными гистологическими методами с финальной заливкой в гистологическую среду Histomix (БиоВитрум, Санкт-Петербург, Россия) и приготовлением серийных срезов толщиной 5–6 мкм на микротоме Leica SM2010 R (Wetzlar, Германия). Окраску срезов гематоксилином и эозином проводили по стандартной гистологической методике [23]. Окрашенные срезы фиксировали в постоянной заливочной среде BioMount (БиоВитрум, Россия).

Для микроскопического исследования препаратов меланомы использовали микроскоп Leica DM 2500 с цифровой камерой Leica DFC 290 (Германия). Карио- и цитометрию проводили на 10 цифровых снимках случайно выбранных полей зрения, полученных с каждого исследуемого препарата при увеличениях $\times 200$, $\times 400$ и $\times 1000$. Программный пакет Fiji (программа, построенная на основе ImageJ v2) с использованием необходимых плагинов применяли для проведения морфометрических исследований [24]. Измерения проводили в микрометрах после предварительной калибровки по шкале объект-микрометра. Ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) клеток меланомы определяли по формуле: $\text{ЯЦО} = S_n / S_{\text{cell}}$, где S_n — площадь ядра клетки, S_{cell} — участок цитоплазмы [25].

Для проведения иммуногистохимических исследований были использованы поликлональные кроличьи антитела *Per2*, *Bmal1*, *Clock* (Cloud-Clone Corp., Хьюстон, Техас, США), 1:200.

Обработанные срезы обезжизняли в спиртах и ксилоле по стандартной схеме и фиксировали в постоянной заливочной среде BioMount (БиоВитрум, Россия).

Экспрессию изучаемых генов оценивали путем подсчета процента окрашенных клеток от общего числа клеток на каждом предметном стекле и выражали в процентах положительных клеток (0–100 %) [26].

Образцы крови брали 4 раза в сутки в 9:00, 15:00, 21:00 и 03:00. Содержание мелатонина в сыворотке крови определяли с использованием коммерческого набора для иммуноферментного анализа (USCN Life Science Inc., Ухань, Китай) с помощью анализатора Sunrise (Sunrise-Basic-Tecan, Grödig, Австрия).

Построение графиков, демонстрирующих динамику величины исследуемых параметров в течение одних суток, 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 парного сравнения и тест Тьюки для сравнения трех и более групп. Различия групп исследования с контрольной оценивали с помощью

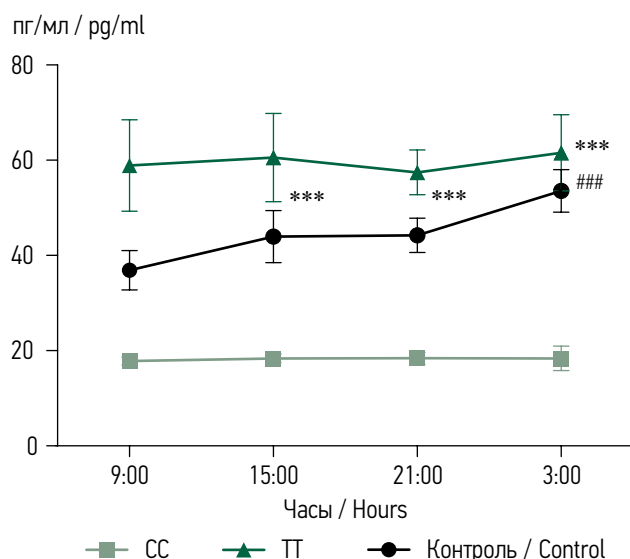


Рис. 1. Суточная динамика содержания мелатонина в крови мышей. *** $p \leq 0,0005$ в сравнении с показателями в 9:00; ### $p \leq 0,0005$ в сравнении с показателями в предыдущую временную точку. Здесь и далее: CC — I опытная группа; TT — II опытная группа; Контроль — животные контрольной группы

Fig. 1. Daily dynamics of melatonin content in the blood of mice. *** $p \leq 0,0005$ in comparison with the indicators at 9:00; ### $p \leq 0,0005$ in comparison with the indicators at the previous time point. Here and further: CC — I experimental group; TT — II experimental group; Control — control group

теста Даннета. При ненормальном распределении использовали тест Манна — Уитни для парного сравнения и тест Данна для сравнения трех и более групп. Статистически значимыми считали различия при уровне статистической значимости (α) или вероятности ошибки

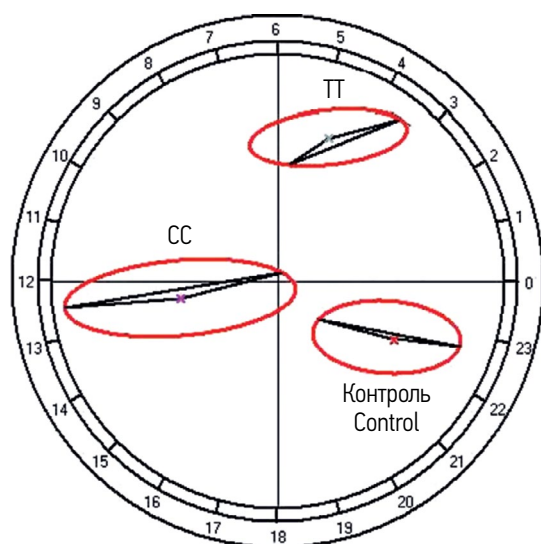


Рис. 2. Результаты косинор-анализа суточной динамики содержания мелатонина в крови мышей

Fig. 2. Results of cosinor analysis of the daily dynamics of melatonin content in the blood of mice

отклонения от нулевой гипотезы или ниже 5 % ($p < 0,05$). При построении графиков изображали среднее арифметическое и стандартное отклонение. Данные отображены в формате $M \pm m$, где M — среднее арифметическое, m — стандартное отклонение среднего арифметического.

Для статистического расчета амплитуды и акрофазы ЦР выполняли 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 аппроксимировали методом наименьших квадратов синусоидой. Определяли наличие достоверного ЦР, а также его акрофазу и амплитуду [27]. Для анализа использовали данные, полученные в результате четырех измерений в течение 1 сут.

Результаты

У животных контрольной группы максимальная концентрация мелатонина в крови наблюдалась ночью, снижаясь до минимума утром. В условиях постоянной темноты суточная динамика менее выражена, а у мышей, содержащихся при постоянном освещении, она практически отсутствует (рис. 1). Результаты косинор-анализа подтверждают эту закономерность, показывая, что у животных, содержащихся при фиксированном световом режиме и в условиях постоянной темноты, наблюдаются достоверные ЦР содержания мелатонина в крови: они характеризуются акрофазой в 22:14 и амплитудой 8,35 пг/мл в первом случае и акрофазой в 05:16 с амплитудой 4,25 пг/мл во втором (рис. 2).

Анализ суточной динамики микроморфометрических показателей клеток меланомы позволил установить, что ядра клеток меланомы у животных контрольной группы достигают максимального размера к 21:00, минимального — к 15:00. У мышей, содержащихся в постоянной темноте, сохраняется такая же картина суточной динамики, но у животных, находящихся при постоянном освещении, максимум отмечается в 9:00, а минимум — в 21:00 (рис. 3, а). Данные косинор-анализа показывают, что достоверный ЦР размера ядер клеток существует только в контрольной группе с акрофазой в 15:48 и амплитудой 1,93 мкм² и во второй опытной группе с акрофазой в 17:39 и амплитудой 1,03 мкм².

В то же время в контрольной группе суточная динамика размеров клеток меланомы демонстрирует максимум в 15:00 и минимум в 21:00. В условиях постоянной темноты максимум сме-

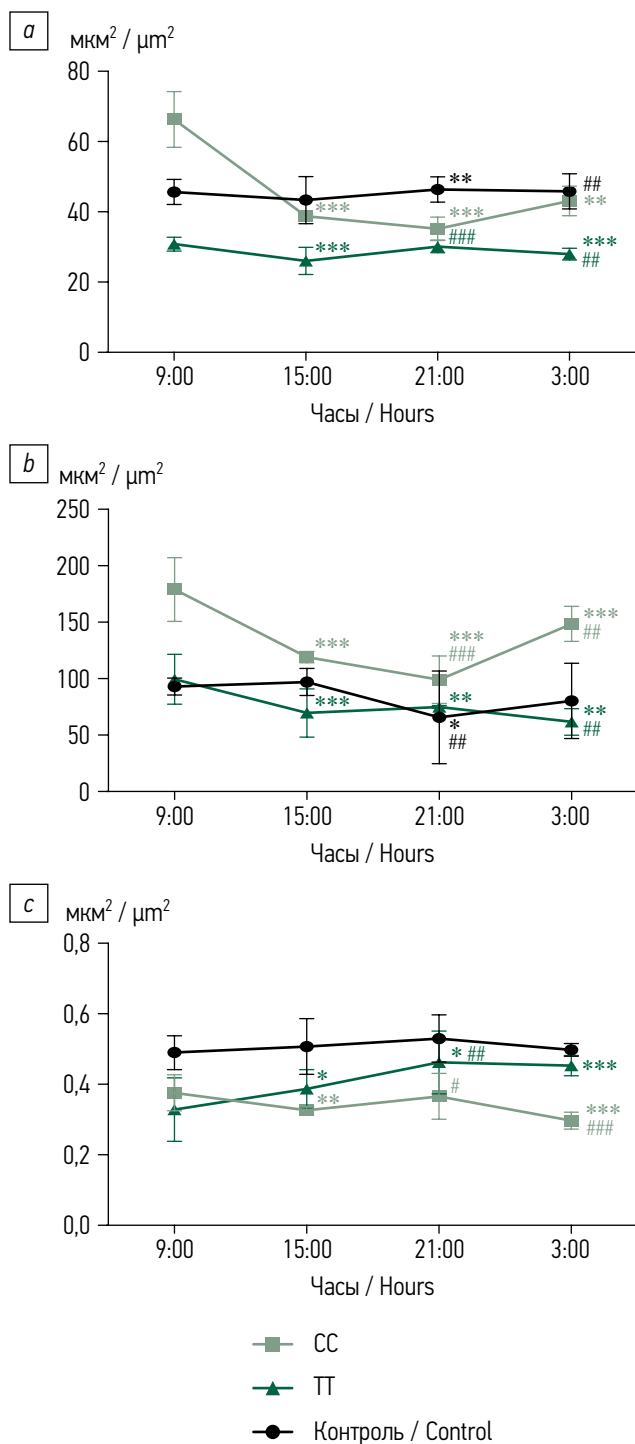


Рис. 3. Суточная динамика изучаемых микроморфометрических показателей клеток меланомы B16: а — площадь ядер; б — площадь клеток; в — ядерно-цитоплазматическое отношение. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ в сравнении с показателями в 9:00; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,005$, ### $p \leq 0,0005$ в сравнении с показателями в предыдущую временную точку

Fig. 3. Daily dynamics of the studied micromorphometric parameters of B16 melanoma cells: а — nuclei area; б — cell area; в — nuclear-cytoplasmic ratio. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ in comparison with the indicators at 9:00; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,005$, ### $p \leq 0,0005$ in comparison with the indicators at the previous time point

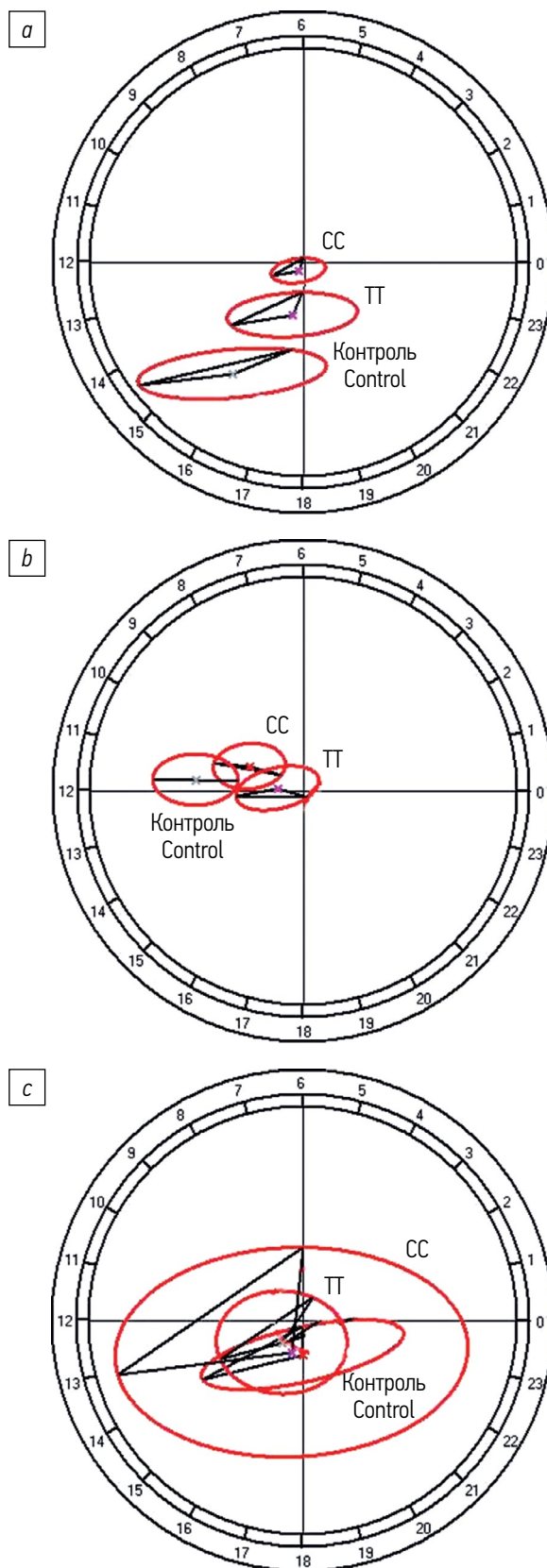


Рис. 4. Результаты косинор-анализа суточной динамики площади ядра (а), клетки (б) и ядерно-цитоплазматического отношения (в) клеток меланомы B16

Fig. 4. Results of cosinor analysis of the daily dynamics of the area of the nucleus (а), cell (б) and nuclear-cytoplasmic ratio (в) of B16 melanoma cells

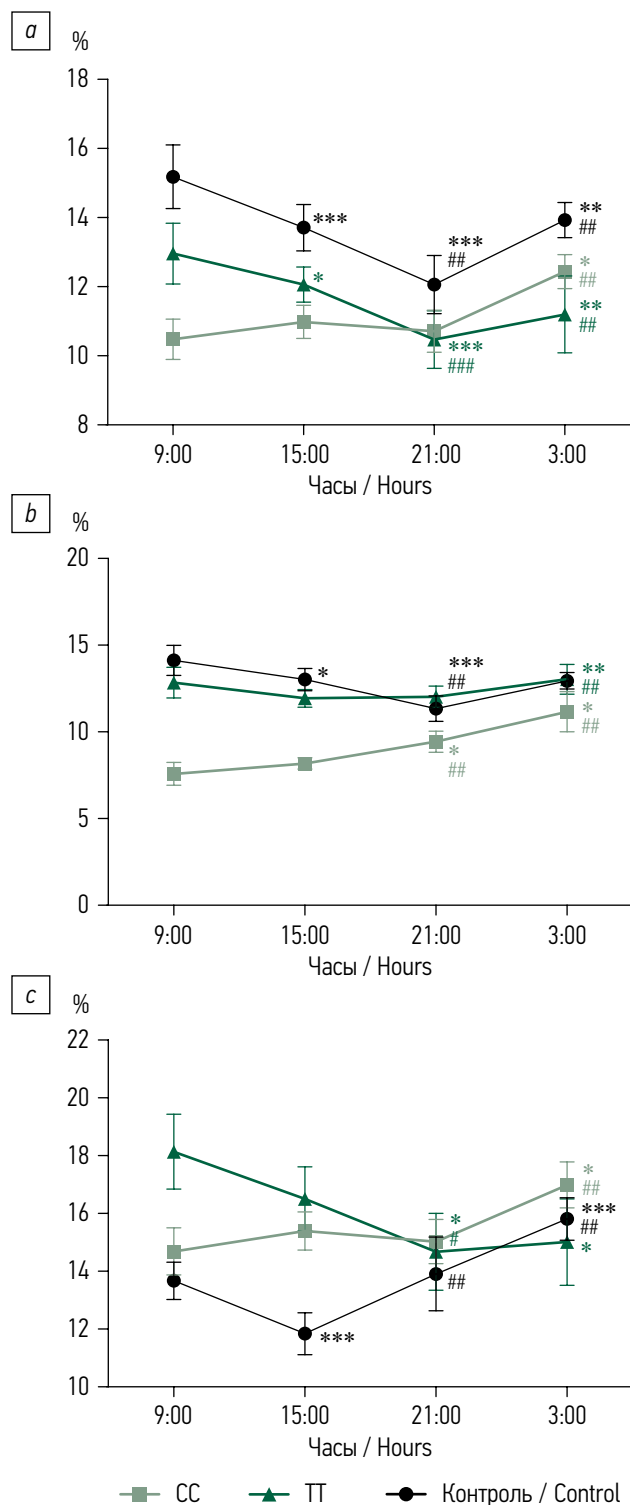


Рис. 5. Суточная динамика экспрессии изученных генов в клетках меланомы B16: *a* — *Bmal1*; *b* — *Clock*; *c* — *Per2*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ в сравнении с показателями в 9:00; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,005$, ### $p \leq 0,0005$ в сравнении с показателями в предыдущую временную точку

Fig. 5. Daily dynamics of expression of the studied genes in B16 melanoma cells: *a* — *Bmal1*; *b* — *Clock*; *c* — *Per2*. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$ in comparison with the indicators at 9:00; # $p \leq 0,05$, ## $p \leq 0,005$, ### $p \leq 0,0005$ in comparison with the indicators at the previous time point

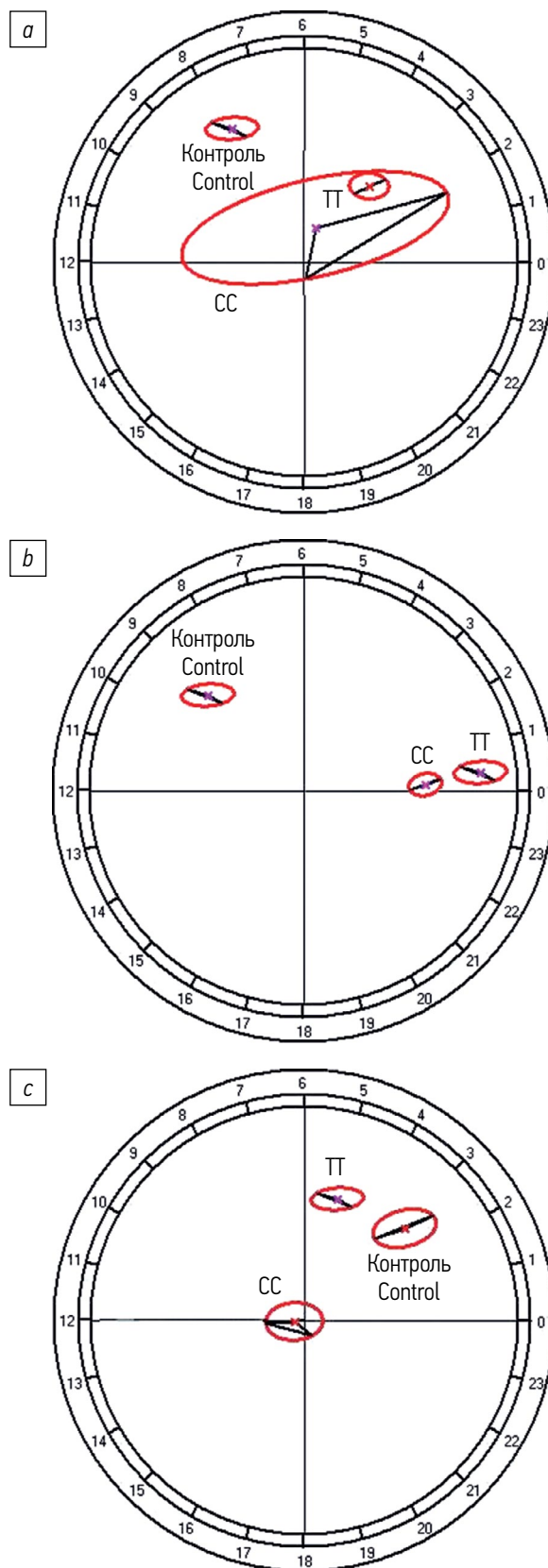


Рис. 6. Результаты косинор-анализа суточной динамики экспрессии *Bmal1* (*a*), *Clock* (*b*) и *Per2* (*c*) клеток меланомы B16

Fig. 6. Results of cosinor analysis of the daily dynamics of expression of *Bmal1* (*a*), *Clock* (*b*) and *Per2* (*c*) in B16 melanoma cells

щается на 9:00, а минимум приходится на 3:00. При постоянном освещении с тем же максимумом минимальные размеры клеток наблюдаются в 21:00 (рис. 3, *b*). Косинор-анализ установил, что достоверные ЦР присутствуют только для первых двух групп, с акрофазами в 10:19 и 5:38 утра и амплитудами 29,66 и 12,24 мкм² соответственно.

Суточная динамика ЯЦО в контрольной и первой экспериментальной (свет/свет) группах характеризовалась максимумом в 21:00 и минимумом в 9:00 (рис. 3, *c*), в I опытной группе максимум смещался к 9:00, а минимум — к 3:00; при этом в результате косинор-анализа ни в одной из групп не было обнаружено достоверного ЦР (рис. 4).

Суточная динамика экспрессии *Bmal1* в клетках опухолей контрольных животных и мышей, содержащихся в постоянной темноте, характеризуется максимумом в 9:00 и минимумом в 21:00, тогда как у животных, содержащихся при постоянном режиме освещения, минимум отмечается в 9:00, а максимум — в 3:00 (рис. 5, *a*). Акрофазы отмечались в 8:38 в контрольной группе и в 2:26 во II опытной группе с амплитудами 1,73 и 0,74 % соответственно, а в I опытной группе достоверного ЦР не обнаружено.

Экспрессия *Clock* в контрольной группе характеризуется максимумом в 9:00 и минимумом в 21:00; у животных I опытной группы максимум отмечался в 3:00, минимум — в 15:00, а у мышей II опытной группы максимум экспрессии отмечен в 3:00, минимум — в 15:00 (рис. 5, *b*). По результатам косинор-анализа ЦР присутствуют во всех группах и характеризуются акрофазами в 9:09, 0:31 и 0:24 с амплитудами 1,54, 1,50 и 5,41 % соответственно.

Экспрессия *Per2* в контроле максимальна в 3:00, снижаясь до минимума к 15:00. Во II опытной группе при максимуме в 9:00 *Per2* наименее интенсивно экспрессируется в 21:00. У животных, содержащихся при постоянном освещении, максимум экспрессии отмечался в 3:00, минимум — в 9:00 (рис. 5, *c*). Достоверный ЦР этого параметра был отмечен только в контрольной и II опытной группе. В контрольной группе амплитуда ритма составила 1,96 % с акрофазой в 2:41, а у животных II опытной группы амплитуда составила 0,82 % с акрофазой в 5:10 (рис. 6).

Обсуждение и заключение

Проведенное исследование показало, что нарушения режима освещения, будь то постоянное освещение или постоянная темнота, приводят к значительным изменениям в структуре изученных ЦР.

Мы установили, что ЦР мелатонина, характерный для фиксированного светового режима,

в условиях постоянной темноты перестраивается и разрушается под воздействием постоянного освещения. Это можно объяснить тем, что мелатонин синтезируется и секретируется шишковидной железой ночью при нормальном соотношении свет/темнота. Эндогенный ритм секреции этого гормона генерируется супрахиазматическими ядрами гипоталамуса и строго подчиняется световому циклу. Световые сигналы способны подавлять выработку мелатонина или синхронизировать ее по графику освещенности (фотосмещение ритма) [28]. Соответственно, в условиях нарушения цикла свет/темнота нарушается и циркадная ритмичность выработки мелатонина. В условиях постоянной темноты ритм становится свободным, не подверженным влиянию внешних времяздатчиков, а при постоянном освещении выработка мелатонина шишковидной железой радикально снижается.

Воздействие мелатонина на клетки может осуществляться через рецепторы мелатонина, расположенные на цитоплазматической мембране. В плазматической мембране охарактеризованы три типа М-рецепторов: MT1 (M1a, MTNR1A), MT2 (M1b, MTNR1B) и MT3 (M1c, MTNR1C) [29]. Первые два типа выявлены у человека. Они относятся к классу серпентиновых рецепторов и связаны с G-белками. Рецепторы MT1 обнаружены в супрахиазматических ядрах гипоталамуса, передней доле гипофиза, кишечнике, почках и клетках меланомы [30].

Ритмы экспрессии *Bmal1* и *Per2* в опухолевых клетках сохранялись под воздействием постоянной темноты, но нарушались в условиях постоянного освещения. По-видимому, это связано с изменением ЦР выработки мелатонина, возникающим под влиянием постоянной темноты, и разрушением ЦР и дефицитом эпифизарного мелатонина при постоянном освещении. Известно, что одним из физиологических эффектов мелатонина является синхронизация экспрессии часовых генов, в первую очередь *Bmal1* и *Per2*. Вызывает ряд вопросов тот факт, что ритм экспрессии *Clock* не нарушался как при постоянном освещении, так и при постоянной темноте. Примечательно также, что акрофазы этого ритма в группах с нарушением светового режима практически совпадают. Приходится констатировать, что во многих работах, посвященных изучению участия мелатонина в работе основных генов биологических часов на различных стадиях их экспрессии в тканях, получены данные, которые с трудом укладываются в какую-то простую умозрительную модель. Спектр возможных эффектов мелатонина на регуляцию основных генов биологических часов очень разнообразен, иерархичен и, вероятно, специфичен для различных тканей и органов [31, 32].

Анализ ритмики микроморфометрических показателей также свидетельствует, что достоверные ЦР площади опухолевых клеток и их ядер присутствуют только в первых двух группах (контроль и темнота/темнота), но разрушаются при постоянном освещении. В свою очередь, ЦР ЯЦО не наблюдался ни в одной из групп, что, по-видимому, связано с высокой частотой морфофункциональных изменений в опухолевой клетке.

Влияние мелатонина на морфологические и функциональные показатели может осуществляться через MT1-, MT2- и, возможно, MT3-мелатониновые рецепторы клетки, а также реализоваться без них, поскольку известно, что мелатонин, обладающий липофильностью и малыми размерами молекулы, способен проникать как в цитоплазму, так и в кариоплазму без помощи рецепторов. В любом случае этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таким образом, исследование показало, что нарушение светового режима вызывает существенные изменения ЦР изучаемых показателей клеток трансплантируемой меланомы B16. При этом если постоянная темнота в большинстве случаев вызывает изменение структуры изучаемых ритмов, то при постоянном освещении происходит их разрушение.

Дополнительная информация

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского» № 122030200535-1 и государственного задания ФГБУН «Институт проблем химической физики Российской академии наук» АААА-А19-119071890015-6.

Соблюдение этических норм. Исследование одобрено Биоэтическим комитетом ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына» (протокол № 34 (10) от 14.03.2022).

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

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, З.В. Гюева, Д.В. Мищенко, Т.В. Безуглова, У.Ю. Аллаярова — концепция и дизайн исследования; М.А. Козлова, А.И. Ануркина — постановка опытов, обработка материала; Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, В.П. Черников, М.В. Мнихович — проведение анализа

и интерпретация полученных данных; Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, М.В. Мнихович — написание текста статьи; Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, В.П. Черников — редактирование текста статьи.

Additional information

Funding source. The work was carried out within the framework of the state task of Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, No. 122030200535-1 and state task of Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry АААА-А19-119071890015-6.

Ethics approval. This research was approved by the Bioethical Committee of the Avtsyn Research Institute of Human Morphology (protocol No. 34 (10) dated 14.03.2022).

Competing interests. The authors declare no competing of interest.

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Personal contribution of each author: Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, З.В. Гюева, Д.В. Мищенко, Т.В. Безуглова, У.Ю. Аллаярова — concept and design research; М.А. Козлова, А.И. Ануркина — staging experiments, processing material; Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, В.П. Черников, М.В. Мнихович — conducting analysis and interpretation of the obtained data; Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, М.В. Мнихович — writing the text of the article; Д.А. Арешидзе, М.А. Козлова, В.П. Черников — editing the text of the article.

Список литературы

1. Panda S. Circadian physiology of metabolism // Science. 2016. Vol. 354, No. 6315. P. 1008–1015. DOI: 10.1126/science.aah4967
2. 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, No. 2. P. 181–191. DOI: 10.1111/joim.12924
3. Fagiani F., Di Marino D., Romagnoli A. et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases // Signal Transduct. Target. Ther. 2022. Vol. 7, No. 1. P. 41. DOI: 10.1038/s41392-022-00899-y
4. Fekry B., Eckel-Mahan K. The circadian clock and cancer: links between circadian disruption and disease pathology // J. Biochem. 2022. Vol. 171, No. 5. P. 477–486. DOI: 10.1093/jb/mvac017
5. Miki T., Matsumoto T., Zhao Z., Lee C.C. p53 regulates Period2 expression and the circadian clock // Nat. Commun. 2013. Vol. 4. P. 2444. DOI: 10.1038/ncomms3444
6. Zhou R., Chen X., Liang J. et al. A circadian rhythm-related gene signature associated with tumor immunity, cisplatin efficacy,

- and prognosis in bladder cancer // *Aging* (Albany NY). 2021. Vol. 13, No. 23. P. 25153–25179. DOI: 10.18632/aging.203733
7. Gaddameedhi S., Sancar A. Melanoma and DNA damage from a distance (farstander effect) // *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011. Vol. 24, No. 1. P. 3–4. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2010.00805.x
 8. Geyfman M., Gordon W., Paus R., Andersen B. Identification of telogen markers underscores that telogen is far from a quiescent hair cycle phase // *J. Invest. Dermatol.* 2012. Vol. 132, No. 3 Pt 1. P. 721–724. DOI: 10.1038/jid.2011.367
 9. Gaddameedhi S., Selby C.P., Kaufmann W.K. et al. Control of skin cancer by the circadian rhythm // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. Vol. 108, No. 46. P. 18790–18795. DOI: 10.1073/pnas.1115249108
 10. Klionsky D.J., Abdel-Aziz A.K., Abdelfatah S. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) // *Autophagy.* 2021. Vol. 17, No. 1. P. 1–382. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280
 11. Deng F., Yang K., Zheng G. Period family of clock genes as novel predictors of survival in human cancer: a systematic review and meta-analysis // *Dis Markers.* 2020. Vol. 2020. P. 6486238. DOI: 10.1155/2020/6486238
 12. Sulli G., Lam M.T.Y., Panda S. Interplay between circadian clock and cancer: New frontiers for cancer treatment // *Trends Cancer.* 2019. Vol. 5, No. 8. P. 475–494. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.07.002
 13. Bumgarner J.R., Nelson R.J. Light at night and disrupted circadian rhythms alter physiology and behavior // *Integr. Comp. Biol.* 2021. Vol. 61, No. 3. P. 1160–1169. DOI: 10.1093/icb/ibab017
 14. Vasey C., McBride J., Penta K. Circadian rhythm dysregulation and restoration: The role of melatonin // *Nutrients.* 2021. Vol. 13, No. 10. P. 3480. DOI: 10.3390/nu13103480
 15. Fárková E., Schneider J., Šmótek M. et al. Weight loss in conservative treatment of obesity in women is associated with physical activity and circadian phenotype: a longitudinal observational study // *Biopsychosoc. Med.* 2019. Vol. 13. P. 24. DOI: 10.1186/s13030-019-0163-2
 16. Yu H.S., Reiter R.J. Melatonin: biosynthesis, physiological effects, and clinical applications. Boca Raton, FL: CRC Press, 1992.
 17. van den Heiligenberg S., Deprés-Brummer P., Barbason H. et al. The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats // *Life Sci.* 1999. Vol. 64, No. 26. P. 2523–2534. DOI: 10.1016/S0024-3205(99)00210-6
 18. Li J.C., Xu F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin // *Biol. Signals.* 1997. Vol. 6, No. 2. P. 77–89. DOI: 10.1159/000109112
 19. Li Y., Li S., Zhou Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, No. 24. P. 39896–39921. DOI: 10.18632/oncotarget.16379
 20. Areshidze D.A., Kozlova M.A., Mnikhovich M.V. et al. Influence of various light regimes on morphofunctional condition of transplantable melanoma B16 // *Biomedicines.* 2023. Vol. 11, No. 4. P. 1135. DOI: 10.3390/biomedicines11041135
 21. Areshidze D.A., Kozlova M.A., Chernikov V.P. et al. Characteristic of ultrastructure of mice B16 melanoma cells under the influence of different lighting regimes // *Clocks Sleep.* 2022. Vol. 4, No. 4. P. 745–760. DOI: 10.3390/clocksleep4040056
 22. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / отв. ред. А.Н. Миронов. Часть первая. Москва: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
 23. Fischer A.H., Jacobson K.A., Rose J., Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections // *CSH Protoc.* 2008. Vol. 2008. P. pdb.prot4986. DOI: 10.1101/pdb.prot4986
 24. Broeke J., Pérez J.M.M., Pascau J. Image Processing with Image. Second edition. Packt Publishing, 2015.
 25. Smitha T., Sharada P., Girish H. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis // *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2011. Vol. 15, No. 1. P. 26–33. DOI: 10.4103/0973-029X.80034
 26. Rubin Grandis J., Melhem M.F., Barnes E.L., Tweardy D.J. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck // *Cancer.* 1996. Vol. 78, No. 6. P. 1284–1292. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960915)78:6<1284::AID-CNCR17>3.0.CO;2-X
 27. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry // *Theor. Biol. Med. Model.* 2014. Vol. 11. P. 16. DOI: 10.1186/1742-4682-11-16
 28. Claustrat B., Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans // *Neurochirurgie.* 2015. Vol. 61, No. 2–3. P. 77–84. DOI: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002
 29. Reppert S.M., Weaver D.R. Comparing clockworks: mouse versus fly // *J. Biol. Rhythms.* 2000. Vol. 15, No. 5. P. 357–364. DOI: 10.1177/074873000129001459
 30. Sugden D., Davidson K., Hough K.A. et al. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story // *Pigment Cell Res.* 2004. Vol. 17, No. 5. P. 454–460. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2004.00185.x
 31. Vriend J., Reiter R.J. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome // *J. Pineal Res.* 2015. Vol. 58, No. 1. P. 1–11. DOI: 10.1111/jpi.12189
 32. Rodríguez-Santana C., Florido J., Martínez-Ruiz L. et al. Role of melatonin in cancer: Effect on clock genes // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, No. 3. P. 1919. DOI: 10.3390/ijms24031919

References

1. Panda S. Circadian physiology of metabolism. *Science.* 2016;354(6315):1008–1015. DOI: 10.1126/science.aah4967
2. 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
3. Fagiani F, Di Marino D, Romagnoli A, et al. Molecular regulations of circadian rhythm and implications for physiology and diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):41. DOI: 10.1038/s41392-022-00899-y
4. Fekry B, Eckel-Mahan K. The circadian clock and cancer: links between circadian disruption and disease Pathology. *J Biochem.* 2022;171(5):477–486. DOI: 10.1093/jb/mvac017
5. Miki T, Matsumoto T, Zhao Z, Lee CC. p53 regulates Period2 expression and the circadian clock. *Nat Commun.* 2013;4:2444. DOI: 10.1038/ncomms3444
6. Zhou R, Chen X, Liang J, et al. A circadian rhythm-related gene signature associated with tumor immunity, cisplatin efficacy, and prognosis in bladder cancer. *Aging (Albany NY).* 2021;13(23):25153–25179. DOI: 10.18632/aging.203733
7. Gaddameedhi S, Sancar A. Melanoma and DNA damage from a distance (farstander effect). *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(1):3–4. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2010.00805.x

8. Geyfman M, Gordon W, Paus R, Andersen B. Identification of telogen markers underscores that telogen is far from a quiescent hair cycle phase. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 1):721–724. DOI: 10.1038/jid.2011.367
9. Gaddameedhi S, Selby CP, Kaufmann WK, et al. Control of skin cancer by the circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(46):18790–18795. DOI: 10.1073/pnas.1115249108
10. Klionsky DJ, Abdel-Aziz AK, Abdelfatah S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition). *Autophagy*. 2021;17(1):1–382. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280
11. Deng F, Yang K, Zheng G. Period family of clock genes as novel predictors of survival in human cancer: a systematic review and meta-analysis. *Dis Markers*. 2020;2020:6486238. DOI: 10.1155/2020/6486238
12. Sulli G, Lam MTY, Panda S. Interplay between circadian clock and cancer: New frontiers for cancer treatment. *Trends Cancer*. 2019;5(8):475–494. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.07.002
13. Bumgarner JR, Nelson RJ. Light at night and disrupted circadian rhythms alter physiology and behavior. *Integr Comp Biol*. 2021;61(3):1160–1169. DOI: 10.1093/icb/icab017
14. Vasey C, McBride J, Penta K. Circadian rhythm dysregulation and restoration: The role of melatonin. *Nutrients*. 2021;13(10):3480. DOI: 10.3390/nu13103480
15. Fárková E, Schneider J, Šmolek M, et al. Weight loss in conservative treatment of obesity in women is associated with physical activity and circadian phenotype: a longitudinal observational study. *Biopsychosoc Med*. 2019;13:24. DOI: 10.1186/s13030-019-0163-2
16. Yu HS, Reiter RJ. Melatonin: biosynthesis, physiological effects, and clinical applications. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992.
17. van den Heiligenberg S, Deprés-Brummer P, Barbason H, et al. The tumor promoting effect of constant light exposure on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in rats. *Life Sci*. 1999;64(26):2523–2534. DOI: 10.1016/S0024-3205(99)00210-6
18. Li JC, Xu F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. *Biol Signals*. 1997;6(2):77–89. DOI: 10.1159/000109112
19. Li Y, Li S, Zhou Y, et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget*. 2017;8(24):39896–39921. DOI: 10.18632/oncotarget.16379
20. Areshidze DA, Kozlova MA, Mnikhovich MV, et al. Influence of various light regimes on morphofunctional condition of transplantable melanoma B16. *Biomedicines*. 2023;11(4):1135. DOI: 10.3390/biomedicines11041135
21. Areshidze DA, Kozlova MA, Chernikov VP, et al. Characteristic of ultrastructure of mice B16 melanoma cells under the influence of different lighting regimes. *Clocks Sleep*. 2022;4(4):745–760. DOI: 10.3390/clockssleep4040056
22. Treshchalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK, et al. Metodicheskie rekomendatsii po doklinicheskomu izucheniyu protivopukholevoi aktivnosti lekarstvennykh sredstv. In: Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ed. by A.N. Mironov. Part I. Moscow: Grif i K, 2012. P. 642–657. (In Russ.)
23. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc*. 2008;2008.pdb.prot4986. DOI: 10.1101/pdb.prot4986
24. Broeke J, Pérez JMM, Pascau J. Image Processing with Image. Second edition. Packt Publishing; 2015.
25. Smitha T, Sharada P, Girish H. Morphometry of the basal cell layer of oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma using computer-aided image analysis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011;15(1):26–33. DOI: 10.4103/0973-029X.80034
26. Rubin Grandis J, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*. 1996;78(6):1284–1292. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0142(19960915)78:6<1284::AID-CNCR17>3.0.CO;2-X
27. Cornelissen G. Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model*. 2014;11:16. DOI: 10.1186/1742-4682-11-16
28. Claustrat B, Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*. 2015;61(2–3):77–84. DOI: 10.1016/j.neuchi.2015.03.002
29. Reppert SM, Weaver DR. Comparing clockworks: mouse versus fly. *J Biol Rhythms*. 2000;15(5):357–364. DOI: 10.1177/074873000129001459
30. Sugden D, Davidson K, Hough KA, et al. Melatonin, melatonin receptors and melanophores: a moving story. *Pigment Cell Res*. 2004;17(5):454–460. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2004.00185.x
31. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin feedback on clock genes: a theory involving the proteasome. *J Pineal Res*. 2015;58(1):1–11. DOI: 10.1111/jpi.12189
32. Rodríguez-Santana C, Florido J, Martínez-Ruiz L, et al. Role of melatonin in cancer: Effect on clock genes. *Int J Mol Sci*. 2023;24(3):1919. DOI: 10.3390/ijms24031919

Информация об авторах / Information about the authors

НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

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

Давид Александрович Арешидзе — канд. биол. наук, заведующий лабораторией патологии клетки.

ORCID: 0000-0003-3006-6281;

eLibrary SPIN: 4348-6781;

e-mail: labcelpat@mail.ru

David A. Areshidze — Cand. Sci. (Med.), Head of Laboratory of Cell Pathology.

ORCID: 0000-0003-3006-6281;

eLibrary SPIN: 4348-6781;

e-mail: labcelpat@mail.ru

Мария Александровна Козлова — канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии клетки.
ORCID: 0000-0001-6251-2560;
eLibrary SPIN: 5647-1372;
e-mail: ma.kozlova2021@outlook.com

Валерий Петрович Черников — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории патологии клетки.
ORCID: 0000-0002-3253-6729;
eLibrary SPIN: 3125-7837;
e-mail: 1200555@mail.ru

Татьяна Васильевна Безуголова — канд. биол. наук, заместитель директора по научной работе.
ORCID: 0000-0001-7792-1594;
eLibrary SPIN: 3943-4400;
e-mail: bezuglovat@mail.ru

Максим Валерьевич Мнихович — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник центральной патологоанатомической лаборатории.
ORCID: 0000-0001-7147-7912;
eLibrary SPIN: 6975-6677;
e-mail: mnichmaxim@yandex.ru

Зарина Владиславовна Гюева — канд. мед. наук, заведующая центральной патологоанатомической лабораторией.
ORCID: 0000-0002-5456-8692;
eLibrary SPIN: 9210-9726;
e-mail: gioeva_z@mail.ru

Анна Игоревна Ануркина — лаборант-исследователь лаборатории патологии клетки.
ORCID: 0009-0003-0011-1114;
eLibrary SPIN: 9812-3412;
e-mail: anyaaai1925@gmail.com

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук», Черноголовка, Россия
Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia

Денис Валериевич Мищенко — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник группы экспериментальной химиотерапии опухолей.
ORCID: 0000-0003-3779-3211;
eLibrary SPIN: 4213-3318;
e-mail: mdv@icp.ac.ru

Угульжан Юлдашовна Аллаярова — младший научный сотрудник группы экспериментальной химиотерапии опухолей.
ORCID: 0000-0002-8264-0997;
eLibrary SPIN: 4996-3473;
e-mail: u.allayarova@icp.ac.ru

Maria A. Kozlova — Cand. Sci. (Biol.), Senior Research Associate of Laboratory of Cell Pathology.
ORCID: 0000-0001-6251-2560;
eLibrary SPIN: 5647-1372;
e-mail: ma.kozlova2021@outlook.com

Valery P. Chernikov — MD, Cand. Sci. (Med.), Leading Research Associate of Laboratory of Cell Pathology.
ORCID: 0000-0002-3253-6729;
eLibrary SPIN: 3125-7837;
e-mail: 1200555@mail.ru

Tatiana V. Bezuglova — Cand. Sci. (Biol.), Deputy Director for Scientific Work.
ORCID: 0000-0001-7792-1594;
eLibrary SPIN: 3943-4400;
e-mail: bezuglovat@mail.ru

Maxim V. Mnikhovich — MD, Cand. Sci. (Med.), Leading Research Associate of the Central Pathology Laboratory.
ORCID: 0000-0001-7147-7912;
eLibrary SPIN: 6975-6677;
e-mail: mnichmaxim@yandex.ru

Zarina V. Gioeva — MD, Cand. Sci. (Med.), Head of the Central Pathology Laboratory.
ORCID: 0000-0002-5456-8692;
eLibrary SPIN: 9210-9726;
e-mail: gioeva_z@mail.ru

Anna I. Anurkina — Research Assistant of Laboratory of Cell Pathology.
ORCID: 0009-0003-0011-1114;
eLibrary SPIN: 9812-3412;
e-mail: anyaaai1925@gmail.com

Denis V. Mishchenko — Cand. Sci. (Biol.), Leading Research Associate of Experimental Tumor Chemotherapy Group.
ORCID: 0000-0003-3779-3211;
eLibrary SPIN: 4213-3318;
e-mail: mdv@icp.ac.ru

Uguljan Yu. Allayarova — Junior Research Associate of Experimental Tumor Chemotherapy Group.
ORCID: 0000-0002-8264-0997;
eLibrary SPIN: 4996-3473;
e-mail: u.allayarova@icp.ac.ru

✉ Контактное лицо / Corresponding author

Давид Александрович Арешидзе / David A. Areshidze
Адрес: Россия, 117418, Москва, ул. Цюрупы, д. 3
Address: 3 Tsurupy St., Moscow, 117418, Russia
E-mail: labcelpat@mail.ru