

ТИМИНА

Мария Филипповна

**ДЛИНА ТЕЛОМЕР ЛЕЙКОЦИТОВ САМЦОВ МАКАК РЕЗУСОВ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ПОТРЕБЛЕНИИ АЛКОГОЛЯ СО СВОБОДНЫМ
ВЫБОРОМ С ВОДОЙ**

3.3.3. Патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (Москва)

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Панченко Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ,
главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией этиопатогенеза
и клиники внутренних заболеваний
Научно-исследовательского института терапии и
профилактической медицины – филиала
«Федеральный исследовательский
центр Института цитологии и генетики
Сибирского отделения РАН

Малютина Софья Константиновна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории
молекулярной генетики человека
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт биохимии и генетики»
Уфимского федерального исследовательского
Центра РАН

Казанцева Анастасия Валерьевна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « » _____ 2026 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета 24.1.242.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: ул. Тимакова, 2, Новосибирск, 630060, тел.: 8 (383)333-65-51

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Пальчикова Н.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Несмотря на принимаемые профилактические меры, злоупотребление алкоголем остается значимой медико-социальной проблемой (*Global status report on alcohol and health*, 2018). Хроническое воздействие этанола приводит к формированию зависимости с запойным потреблением и абстинентным синдромом, а также сопровождается патологическими изменениями многих органов и систем организма, в частности печени (Barr et al., 2016; Газатова и др., 2019), центральной нервной системы и сердечно-сосудистой системы (Kupari и Koskinen, 1992; Rampoldi et al., 2019). При этом ассоциированный с употреблением алкоголя канцерогенный риск указывает на отсутствие определенного «безопасного» порога выше нулевого (Manthey, Shield и Rehm, 2022; Anderson et al., 2023).

Потенциальным маркером неблагоприятного воздействия этанола на субклеточном уровне может служить укорочение теломер – один из ключевых механизмов клеточного старения, связанный с ограничением пролиферативного потенциала клеток и риском смерти от дыхательных, желудочно-кишечных и сердечно-сосудистых заболеваний (Hayflick, 1965; Schneider et al., 2022). Известно, что потребление высоких разовых доз алкоголя (binge drinking) ассоциировано как с окислительным стрессом, так и с меньшей длиной теломер. Вместе с тем результаты клинико-эпидемиологических исследований, посвященных изучению связи потребления алкоголя с длиной теломер, остаются противоречивыми. В разных работах описаны укорочение, отсутствие изменений и увеличение длины теломер, причем направление изменений не всегда связано с уровнем потребления алкоголя. Расхождения во многом обусловлены методическими ограничениями, такими как субъективная оценка потребления по анкетам, неоднородность выборок и отсутствие ясной зависимости «доза – эффект» (Dixit et al., 2019). Нерешенным остается вопрос возможного наличия безопасного уровня потребления или порогового воздействия этанола, при превышении которого наблюдается укорочение теломер, как это наблюдается при явном злоупотреблении алкоголем. Нельзя исключить, что укорочение длины теломер является вторичным процессом, обусловленным органной патологией, метаболическими нарушениями и окислительным стрессом, развивающимися в результате злоупотребления алкоголем (Panchenko et al., 2022). Это создает потребность в длительных контролируемых исследованиях с объективной регистрацией потребления этанола, проведение которых у здоровых лиц имеет этические ограничения.

Экспериментальные исследования, лишенные ограничений клинических и эпидемиологических наблюдений, могли бы прояснить характер связи потребления алкоголя с длиной теломер. Однако данные о влиянии этанола на длину теломер *in vivo* крайне малочисленны. Таким образом, на основании имеющихся в литературе данных установить единый характер влияния хронического потребления этанола на теломеры не представляется возможным. Длительные контролируемые исследования на лабораторных высших приматах,

позволяющие проследить динамику длины теломер в зависимости от индивидуального уровня потребления этанола и периодов абстиненции, отсутствуют.

Лабораторные приматы представляют перспективную модель, которую на протяжении нескольких десятилетий используют для изучения действия алкоголя на организм. Важным фактором является возможность воспроизведения парадигмы свободного выбора между этанолом и водой, в которой происходит хроническое употребление алкоголя людьми. Этот подход может позволить объективно оценить, связано ли длительное потребление этанола с изменением длины теломер лейкоцитов. Таким образом, представляется актуальным изучить изменение длины теломер в эксперименте с хроническим потреблением алкоголя у макаков резусов.

Степень разработанности темы исследования. В культивируемых клетках теломеры обычно укорачиваются на 50–200 пар оснований за цикл репликации, а в лейкоцитах взрослых людей примерно на 25 пар оснований в год. При достижении критической длины около 5 тыс. пар оснований запускаются сенесценция или апоптоз клеток (Takubo et al., 2002). Динамика теломер определяется не только числом клеточных делений, но и интенсивностью повреждающих воздействий, поэтому их рассматривают одновременно как показатель репликативного возраста и накопленного клеточного стресса (Sanders и Newman, 2013; Koliada et al., 2015; Notterman и Schnerper, 2020).

На молекулярном уровне описан ряд механизмов повреждающего действия этанола. Этанол, являясь амфифильной молекулой, изменяет свойства клеточных мембран, нарушает ионные градиенты и клеточный гомеостаз (Carvalho et al., 2020), а также влияет на митохондрии, снижая эффективность окислительного фосфорилирования и синтеза аденозинтрифосфата (Young et al., 2006). Его метаболизм сопровождается образованием активных форм кислорода и окислительным стрессом, повреждающим липиды, белки и нуклеиновые кислоты (Wu и Cederbaum, 2003). При абстиненции у пациентов описано повышение активности ферментов антиоксидантной защиты (Прокопьева и др., 2017; Бохан и др., 2018). Теломерная ДНК является одной из чувствительных мишеней окислительного повреждения. Окислительный стресс ускоряет потерю длины теломер и нарушает активность теломеразы, способствуя преждевременной сенесценции; дополнительно обсуждается формирование порочного круга «митохондрии – активные формы кислорода – повреждения ДНК – укорочение теломер» (Zglinicki, 2002; Анисимов, 2003).

В отношении длины теломер клеток в культуре при воздействии этанола имеются единичные исследования. На культуре иммортализованных и первичных фибробластов кожи и клеток гепатоцеллюлярной карциномы этанол в концентрации 25 мМ в течение недели вызвал умеренное укорочение теломер, аналогичный эффект наблюдали при воздействии 25 мкМ ацетальдегида, а сочетание воздействия этанола с ингибитором алкогольдегидрогеназы уменьшало повреждение теломер. Это указывает на роль метаболизма этанола в повреждении теломер (Harpaz et al., 2018). В эмбриональных стволовых клетках человека,

подвергнутых воздействию 0, 25, 50 или 100 мМ этанола в течение 3, 7 или 14 суток, изменение длины теломер зависело прежде всего от продолжительности экспозиции, а не от концентрации. Через 7 суток экспозиции длина теломер уменьшалась, а после 14 дальнейшего укорочения теломер не наблюдали (Moazzam et al., 2021). Таким образом, продолжительность воздействия этанолом является важным модулирующим фактором.

Экспериментальные работы *in vivo* также показывают противоречивые результаты. У рыб *Danio rerio*, фенотипически предпочитающих этанол, показано уменьшение относительной длины теломер в головном мозге (Moraes et al., 2023). У самок мышей CD1 при длительном потреблении алкоголя укорочение теломер было зарегистрировано только при употреблении раствора этанола в воде, но не красного вина, на фоне высокожировой диеты. При стандартном рационе значимых различий длины теломер в ооцитах, сердце и ткани хвоста между группами не выявлено (Garcia-Moruno et al., 2025).

Таким образом, связь потребления алкоголя с длиной теломер изучена преимущественно в клинических и эпидемиологических работах. В проведенном нами систематическом обзоре ассоциация потребления алкоголя с укорочением теломер выявлена в 16 из 28 исследований, тогда как в 12 работах статистически значимая связь отсутствовала или наблюдалось увеличение длины теломер (Panchenko et al., 2022).

На данный момент причинный характер связи длины теломер с потреблением алкоголя, а также ее дозозависимость остаются недостаточно определенными.

Цель исследования: установить характер влияния хронического потребления этанола самцами макак резусов в условиях свободного выбора с водой на длину теломер лейкоцитов, лейкоцитарный профиль крови и уровень окислительного стресса.

Задачи исследования:

1. При моделировании алкогольной мотивации у макак резусов в условиях свободного выбора с водой определить уровень потребления этанола, его содержание в крови, отобрать для длительного наблюдения животных с низким (НПЭ) и высоким (ВПЭ) уровнем сформированного потребления и охарактеризовать гормонально-биохимические изменения у них.

2. Выполнить анализ потенциального влияния на длину теломер лейкоцитов крови разрыва устойчивых социальных связей и содержания в ограниченном пространстве как условий, часто сопутствующих выполнению опытов у обезьян, на примере самцов яванских макак.

3. Оценить уровень окислительного стресса по активности каталазы и содержанию ТБК-активных продуктов в сыворотке крови, а также изменения лейкоцитарного профиля при хронической алкоголизации на протяжении 920 дней и в периоде лишения.

4. Определить среднюю абсолютную и относительную длину теломер лейкоцитов периферической крови до и в течение длительного периода потребления алкоголя, а также при его лишении.

5. Провести анализ возможного изменения длины теломер с возрастом как независимого от действия этанола фактора, путем изучения средней длины теломер лейкоцитов в образцах периферической крови, полученных в поперечном исследовании от интактных макак резусов разного возраста и пола при групповом содержании.

Научная новизна исследования. По данным доступной нам научной литературы, впервые в мире на модели длительного добровольного потребления этанола самцами макак резусов в условиях свободного выбора с водой проведена комплексная оценка динамики уровня потребления этанола, его содержания в крови, длины теломер лейкоцитов, показателей окислительного стресса и гематологических показателей. Установлено отсутствие ассоциации хронического многолетнего потребления этанола с медианой до 3,03 г/кг в сутки с уменьшением длины теломер лейкоцитов крови.

Впервые в мире в продольном эксперименте на взрослых макаках показано, что перевод животных из стабильных социальных групп в условия индивидуального содержания сопровождается быстрым, в течение 60 суток, уменьшением длины теломер лейкоцитов крови.

Впервые в России на выборке макак резусов обоих полов, охватывающей возрастной диапазон от 1 до 24 лет, проведена оценка возрастных и половых различий средней длины теломер лейкоцитов крови. При поперечном исследовании в полученной выборке статистически значимых возрастных и половых различий не выявлено.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационного исследования расширяют представления о биологии теломер у макак: при различных условиях содержания у яванских макак и у макак резусов разного возраста, а также при хроническом воздействии этанола у самцов макак резусов.

Показано, что многолетнее потребление алкоголя самцами макак резусов в условиях свободного выбора с водой сопровождается нарушением липидного обмена и формированием холестатического синдрома, но не ассоциировано с уменьшением длины теломер лейкоцитов крови.

Практически значимым является выявленное уменьшение длины теломер после перевода животных из группового в индивидуальное содержание, что требует учета условий содержания при планировании и интерпретации исследований на лабораторных приматах. Эти результаты могут быть использованы для оптимизации условий содержания, снижения стрессовой нагрузки и повышения надежности молекулярно-генетических показателей, включая длину теломер.

Экспериментальная модель свободного выбора этанола у макак резусов может быть использована для изучения механизмов формирования алкогольной мотивации и алкоголь-индуцированных изменений на молекулярном и системном уровнях, а также для апробации профилактических и терапевтических подходов.

Материалы работы могут быть применены в образовательном процессе при подготовке специалистов по патологической физиологии и токсикологии и при

разработке учебных модулей по экспериментальным моделям хронических воздействий повреждающих факторов.

Методология и методы исследования. *In vivo* моделирование является основным методологическим подходом настоящего диссертационного исследования. Использование макак резусов в качестве модельного объекта обосновано их филогенетическим, анатомическим, нейроиммунноэндокринным, поведенческим и социальным сходством с человеком (Shively et al., 2009), что повышает корректность интерпретации и переносимость результатов. Для формирования алкогольной мотивации применен подход свободного выбора между этанолом и водой, позволяющий исключить стрессовые эффекты принудительного введения алкоголя и выделить животных с естественно сформированной мотивацией. В работе использованы гематологические, биохимические и молекулярно-генетические методы исследования биологического материала. Результаты обобщены, подвергнуты статистической обработке и сопоставлены с данными мировой литературы, что в совокупности позволяет считать сформулированные выводы достоверными.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Хроническое потребление алкоголя в условиях свободного выбора с водой самцами макак резусов при длительности 917 суток с медианой потребления до 3,03 г/кг этанола в сутки (эквивалентно 35–42 стандартным дозам в неделю у человека) и уровне этанола в крови до 160 мг/дл приводит к нарушению липидного обмена и формированию холестатического синдрома, но не вызывает уменьшения длины теломер лейкоцитов крови.

2. Стресс, ассоциированный с нарушением социальных связей, является значимым фактором уменьшения длины теломер у самцов яванских макак.

3. При медиане потребления этанола самцами макак резусов менее 3,03 г/кг в сутки значимый системный окислительный стресс не развивается.

4. При поперечном исследовании у макак резусов, содержащихся в социальных группах, в возрастном диапазоне от 1 до 24 лет длина теломер лейкоцитов крови характеризуется отсутствием значимых возрастных и половых различий.

Степень достоверности исследований. Достоверность результатов работы обеспечена использованным методологическим подходом, достаточным объемом экспериментального материала, современными молекулярно-генетическими, биохимическими и гематологическими методами исследования, количественной обработкой полученных данных с использованием корректных статистических методов анализа. Все результаты оригинальны, заимствования без указания автора или источника отсутствуют.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы апробированы на общероссийских и международных научных мероприятиях (2019–2024 гг.), включая конференции «Молодые ученые в медицине и биологии» (2019, электронный формат) и «Инновационные исследования в биологии и медицине» (Сочи, 2020), молодежную научную школу «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2020),

XXIII Зимнюю молодежную школу по биофизике и молекулярной биологии (Санкт-Петербург, Репино, 2024).

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-25-20192 под руководством кандидата биологических наук Агумава Аслана Анзоровича; проект успешно завершен.

Основные научные результаты диссертационного исследования представлены в 9 научных публикациях, включая 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, из которых 2 опубликованы в журналах, индексируемых международными системами цитирования Scopus или Web of Science.

Внедрение результатов в практику. Результаты исследования внедрены в образовательный процесс учебно-научного департамента биомедицинских, ветеринарных и экологических направлений Сочинского института (филиала) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (справка о внедрении № 02-18/2084 от 08.12.2025 г.).

Личный вклад соискателя.

Автор самостоятельно выполнил основную часть экспериментальных и молекулярно-генетических исследований, включая сбор и подготовку проб биологического материала (крови и сыворотки), анализ длины теломер и маркеров окислительного стресса, а также статистическую обработку данных. Автор также провел углубленный анализ современной отечественной и зарубежной литературы по влиянию этанола на длину теломер, роли окислительного стресса и их взаимосвязанным механизмам. Автор принимал непосредственное участие в эксперименте по моделированию хронического потребления этанола у макаков резусов. Данные биохимического анализа сыворотки крови получены совместно с Киргинцевым Р.М.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.3.3 «Патологическая физиология» согласно пунктам 1 и 5:

П.1. Исследование особенностей этиологических факторов, вызывающих развитие повреждения, и характера их воздействия на уровне клеток, органов и систем организма.

П.5. Изучение факторов, предрасполагающих к развитию болезни, их влияние на состояние здоровья до развития болезни и исследование их роли в патогенезе болезни на всем протяжении этого процесса – от состояния предболезни до выздоровления.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, результаты, выводы и практические рекомендации. В тексте представлены 11 таблиц и 25 рисунков. Список литературы насчитывает 187 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проведено на базе лаборатории молекулярной биологии ККМП НИЦ КИ (ранее ФГБНУ «НИИ МП») в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, изложенными в директиве Европейского сообщества 2010/63/ЕС. Протоколы исследования утверждены биоэтическим комитетом Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» (протокол № 50 от 28.07.2020) и локальным этическим комитетом по вопросам биомедицинских исследований Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (протокол № 02-3 от 28.05.2025).

Материалы и методы исследования

Животные

Материалом для работы послужили макаки резусы обоего пола ($n = 121$) и самцы макак яванских ($n = 10$) (питомник Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт» (ранее – ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия). Все животные были рождены в питомнике при содержании группами в открытых вольерах с доступом к утепленным внутренним помещениям.

Для анализа вклада возрастных изменений в ходе длительной алкоголизации животных как независимого от действия этанола фактора использовали образцы венозной крови 85 клинически здоровых макак резусов в возрасте 1–24 года (41 самка и 44 самца), собранные в ходе плановых ветеринарных осмотров в пробирки с К₂-ЭДТА без проведения дополнительных инвазивных вмешательств. Для оценки возможного влияния хранения ДНК дополнительно исследовали 22 образца ДНК из крови самцов макак резусов, хранившихся около двух лет при –80 °С, и 22 образца свежевыделенной ДНК от сопоставимых по возрасту (10–19 лет) и условиям содержания самцов. Животные обеих групп содержались в групповых открытых вольерах; выделение ДНК проводили идентичным методом, определение длины теломер – в единой серии ПЦР.

Эксперимент хронического алкогольного воздействия проведен на здоровых половозрелых самцах макак резусов в возрасте 8–16 лет ($n = 36$), переведенных из уличных вольеров в индивидуальные клетки из нержавеющей стали, оснащенные системой отключения подачи воды, при сохранении зрительного, слухового и обонятельного контакта между особями (без тактильного взаимодействия). Перед началом исследования выполнены карантин и адаптация к условиям индивидуального содержания. Пищевой рацион включал комбикорм, произведенный по технологии компании «Altromin» (Германия), а также свежие овощи и фрукты. Для оценки средней длины теломер в динамике, биохимических маркеров и лейкоцитарной формулы из 36 самцов макак резусов отобрали 14 животных по индивидуальным медианным значениям суточного потребления этанола (г/кг массы тела/сут.) за первые 55 суток этапа поддержания алкогольной

мотивации. Сформировали две группы: с наиболее низким (НПЭ, $n = 6$) и наиболее высоким (ВПЭ, $n = 8$) уровнем потребления этанола.

Поскольку материал от макак резусов, участвовавших в эксперименте по потреблению этанола, получен при индивидуальном содержании, для оценки возможного влияния такой социальной изоляции (разрыв связи с группой) на длину теломер дополнительно использовали парные образцы крови от самцов макак яванских в возрасте 11–17 лет ($n = 10$), полученные после завершения основного диссертационного исследования в рамках отдельного исследования. До начала манипуляций макаки яванские содержались в устойчивых социальных группах по 3–4 особи. Далее животных переводили в индивидуальные клетки с полным исключением контакта с ранее знакомыми особями, при этом первый забор крови выполняли в период группового содержания для характеристики исходной длины теломер, второй – спустя 60 дней индивидуального содержания в условиях, воспроизводящих режим, примененный в эксперименте с самцами макак резусов.

Моделирование хронического потребления алкоголя

Моделирование потребления алкоголя проводили по ранее апробированной методике (Тимина и др., 2023), включающей этапы адаптации, инициации алкогольной мотивации и ее поддержания. После карантина выполняли 26-суточную адаптацию – приучение к потреблению водного раствора некалорийного подсластителя из индивидуальных поилок. Далее проводили индукцию алкогольной мотивации (0–62 сутки): ежедневно на 1 час предоставляли доступ к раствору этанола с некалорийным подсластителем при отсутствии доступа к воде. В первые 31 сутки концентрацию этанола повышали с 1% до 4% при увеличении лимита потребленной дозы с 0,5 до 2 г/кг, последующие 31 сутки использовали 4% раствор без ограничений дозы. Далее на этапе поддержания обеспечивали круглосуточный свободный доступ к 4% раствору этанола без подсластителя при наличии неограниченной питьевой воды. Данный режим считается оптимальным для устойчивого поддержания алкогольной мотивации у макак резусов (Vivian et al., 1999). Выполнены два периода абстиненции (433–462 и 721–750 сутки). Общая длительность эксперимента от первого предъявления этанола составила 920 суток. Для приготовления растворов использовали 95 % этиловый спирт (ООО «Константа-Фарм М», Россия). Ежедневно регистрировали объем потребленного раствора этанола и рассчитывали его среднесуточное потребление (г/кг/сутки).

На различных этапах эксперимента у животных отбирали венозную кровь. Забор венозной крови проводили утром в 9:00 (UTC+3:00) из подкожной вены плеча до кормления, без применения седативных средств. Кровь собирали в пробирки с K_2 -ЭДТА для гематологического анализа на автоматическом анализаторе HumaCount 30TS (Германия) и в пробирки с активатором свертывания для получения сыворотки и биохимических исследований. Для подсчета лейкоцитарной формулы изготавливали мазки крови, фиксировали и окрашивали по методу Май-Грюнвальду; микроскопию выполняли с масляной

иммерсией (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$), подсчет клеток проводили с использованием счетчика СЛ-1 (Россия).

Ультразвуковое исследование

Для мониторинга соматических изменений ежегодно выполняли ультразвуковое исследование сердца и печени на аппарате Chison SonoTouch 60 (датчики Chison MC6-E и Chison P6-E) под комбинированной анестезией: тилетамин–золазепам (Zoletil® 100, 5 мг/кг) и ксилазин (Xyla 2%, 2 мг/кг).

Методы ПЦР

Оценку средней длины теломер выполняли методом полимеразной цепной реакции по Sawthorn (2002) для определения относительной средней длины теломер и по O'Callaghan и Fenech (2011) для определения абсолютной средней длины теломер. Нуклеиновые кислоты выделяли из лейкоцитов периферической крови, полученных из образцов крови, стабилизированных K2-ЭДТА, с использованием коммерческого набора S-сорб (Синтол, Россия) по инструкции производителя. Выделенные образцы ДНК хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа. Среднюю длину теломер определяли в образцах ДНК, полученных в фоновом периоде (-32 сутки), в периодах потребления этанола (92, 717 и 917 сутки) и в периоде лишения этанола (749 сутки). Перед постановкой реакций оценивали концентрацию и отсутствие деградации ДНК (спектрофотометрия и электрофорез в агарозном геле).

Условия количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени оптимизировали с использованием серий разведений синтетического стандарта теломерной последовательности (ЗАО «Евроген», Россия) и образцов геномной ДНК. В качестве однокопийного гена использовали 36B4. Пробы ДНК приводили к единой концентрации по данным спектрофотометрии и контрольной реакции с праймерами к β -глобину; состав реакционной смеси оптимизировали для повышения эффективности амплификации. Использовали следующую температурную программу – активация полимеразы $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 минут; далее 30 циклов ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 секунд, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 секунд, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 секунд) с регистрацией флуоресценции при $65\text{ }^{\circ}\text{C}$; заключительная элонгация $72\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для оценки относительной длины теломер проводили амплификацию теломерных повторов и гена 36B4; для абсолютной применяли синтетические стандарты теломерной последовательности $(\text{TTAGGG})_{14}$ и фрагмента 36B4 (очистка – высокоэффективная жидкостная хроматография). Межпостановочную воспроизводимость контролировали объединенной пробой ДНК (смесь равных количеств всех образцов). Абсолютную длину теломер рассчитывали как отношение суммарной длины теломерных повторов в реакции (по интерполяции по стандартной кривой) к числу диплоидных геномных копий (по однокопийному гену) с последующим делением на количество хромосомных концов в диплоидном геноме изучаемого вида. Результат выражали в тысячах пар оснований на одну теломеру. Все реакции выполняли в трех технических повторностях. В анализ включали образцы, для которых стандартное отклонение порогового цикла между повторностями не превышало одного цикла, а значения амплификации находились в линейном диапазоне стандартных кривых.

Биохимические исследования сыворотки крови

Концентрацию этанола в сыворотке определяли ферментативным методом с использованием набора «Этанол–Ольвекс» (ООО «Ольвекс диагностика», Россия). Уровень веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-активные продукты), оценивали с применением набора «ТБК–Агат» (ООО «Агат–Мед», Россия). Активность каталазы в сыворотке определяли ферментативным методом с использованием набора Catalase A007–1 (Cloud–Clone Corp., США). Реакции определения ТБК-активных продуктов и активности каталазы проводили в двух повторностях, результат усредняли. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре IMPLEN NanoPhotometer NP80 (Германия) в стандартных кюветах с длиной оптического пути 10 мм и рабочим объемом от 0,5 мл. Методом иммуноферментного анализа определяли содержание кортизола и дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-С) с использованием наборов ООО «ХЕМА» на анализаторе MultiskanEX. Прочие биохимические показатели определяли наборами High Technology, Inc. на полуавтоматическом анализаторе Biochem SA.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8.0. Нормальность распределения оценивали критериями Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка. Для сравнения двух независимых выборок использовали непарный t-критерий Стьюдента или t-критерий с поправкой Уэлча, для зависимых выборок – парный t-критерий. При множественных и повторных измерениях применяли одно- и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) или смешанную модель с последующими множественными сравнениями. Для данных с ненормальным распределением использовали критерии Краскела–Уоллиса или Фридмана с апостериорным тестом Данна в зависимости от характера выборок. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициентов Пирсона или Спирмена; при необходимости применяли линейный регрессионный анализ. Результаты представляли как $M \pm SEM$ или $M \pm SD$. Критический уровень значимости принимали равным $p < 0,05$.

Результаты исследования

Потребление этанола, соматические и биохимические изменения

В ходе эксперимента ежедневно количественно оценивали потребление этанола. Медианные значения существенно различались между группами и оставались стабильными, с небольшой тенденцией к увеличению, что подтверждает устойчивое формирование различий в алкогольной мотивации: в первом периоде фазы поддержания у животных группы НПЭ индивидуальное медианное потребление составляло от 0,14 до 0,94 г/кг/сут., у животных группы ВПЭ – от 1,92 до 3,03 г/кг/сут. (Рисунок 1).

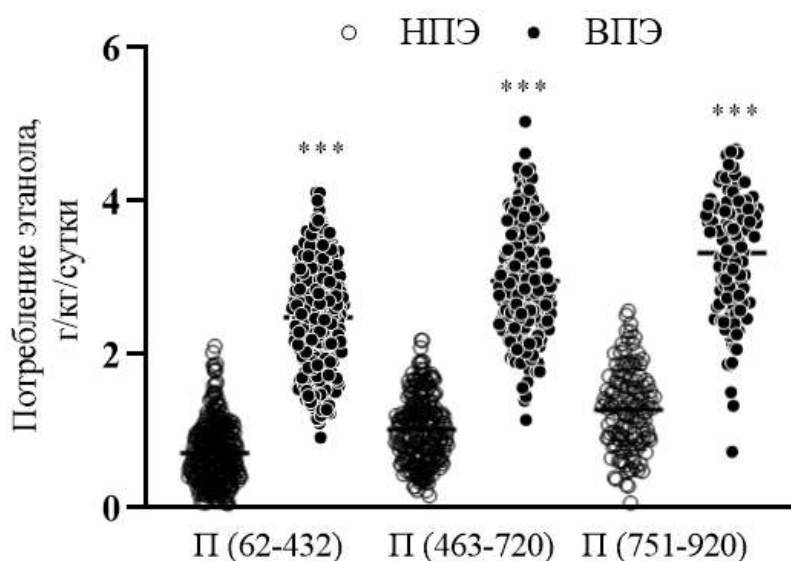


Рисунок 1 – Уровень потребления этанола животными. П – период поддержания алкогольной мотивации, в скобках указаны сутки опыта. НПЭ – группа низкого потребления этанола. ВПЭ – группа высокого потребления этанола. Приведены индивидуальные значения, горизонтальной линией отмечена медиана. *** – $p < 0,001$, отличия между группами на данный срок наблюдения

Пересчет на человека показывает, что потребление этанола в дозе 3,03 г/кг у макаки массой ~10 кг соответствует 30,3 г этанола в сутки; с учетом коэффициента пересчета для макак 3,1 (CDER FDA) это составляет около 59 г этанола для человека массой 60 кг, то есть 5–6 стандартных доз в сутки (35–42 в неделю). При интерпретации важен также достигаемый уровень этанола в крови, определяющий токсикологические эффекты.

Средний уровень этанола в сыворотке статистически значимо отличался между группами НПЭ и ВПЭ в периоды поддержания 2 и 3: 37 ± 4 мг/дл против 77 ± 10 мг/дл ($p < 0,05$) и 8 ± 2 мг/дл против 53 ± 14 мг/дл ($p < 0,001$) (Рисунок 2), соответственно. Максимальный зарегистрированный уровень этанола в крови составил 160 мг/дл, что соответствует легкой степени опьянения у человека. Внутри подгрупп отмечалась выраженная вариабельность, вероятно связанная с циркадианной неравномерностью потребления и фиксированным утренним

временем забора крови. Ранее показан ритм потребления с акрофазой около 15:00 (UTC+3:00) (Панченко *и др.*, 2022), поэтому пиковые концентрации могли быть не зафиксированы. Клинических признаков интоксикации в течение наблюдения не отмечалось.

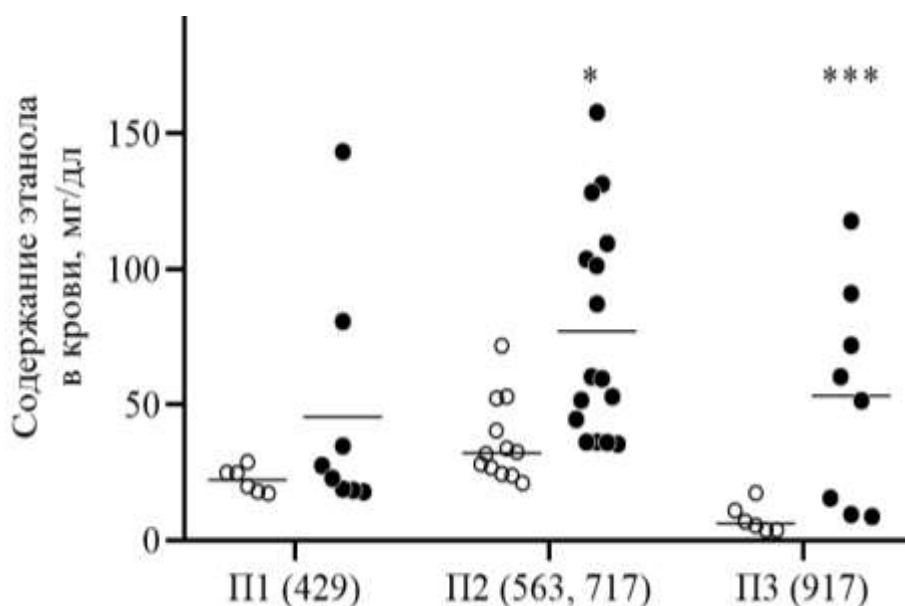


Рисунок 2 – Содержание этанола в сыворотке крови животных. П – период поддержания алкогольной мотивации, в скобках указаны сутки опыта. НПЭ – группа низкого потребления этанола. ВПЭ – группа высокого потребления этанола. Приведены индивидуальные значения, горизонтальной линией отмечено среднее значение. *, *** – $p < 0,05$, $p < 0,001$, отличия между группами на данный срок наблюдения

Исходно группы НПЭ и ВПЭ не различались по оцененным анатомо-физиологическим параметрам. К 722-м суткам в группе ВПЭ масса тела уменьшилась на 9 % относительно исходного значения ($p = 0,030$), тогда как в группе НПЭ значимых изменений не выявлено. Ультразвуковое исследование печени и сердца не выявило структурных изменений.

Длительная экспозиция сопровождалась биохимическими изменениями: в группе ВПЭ с 92-х суток повышался уровень триглицеридов ($p < 0,05$, $p < 0,01$), с 717-х суток – активность гамма-глутамилтранспептидазы ($p < 0,05$); уровень общего холестерина снижался в обеих группах ($p < 0,05$, $p < 0,01$), а к 917-м суткам в обеих группах увеличивалось содержание общего билирубина ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Совокупность изменений свидетельствует о нарушении липидного обмена и формировании холестатического синдрома без выраженного цитолитического повреждения печени.

Результаты гематологического анализа

Общее число лейкоцитов в ходе эксперимента оставалось стабильным (Рисунок 3).

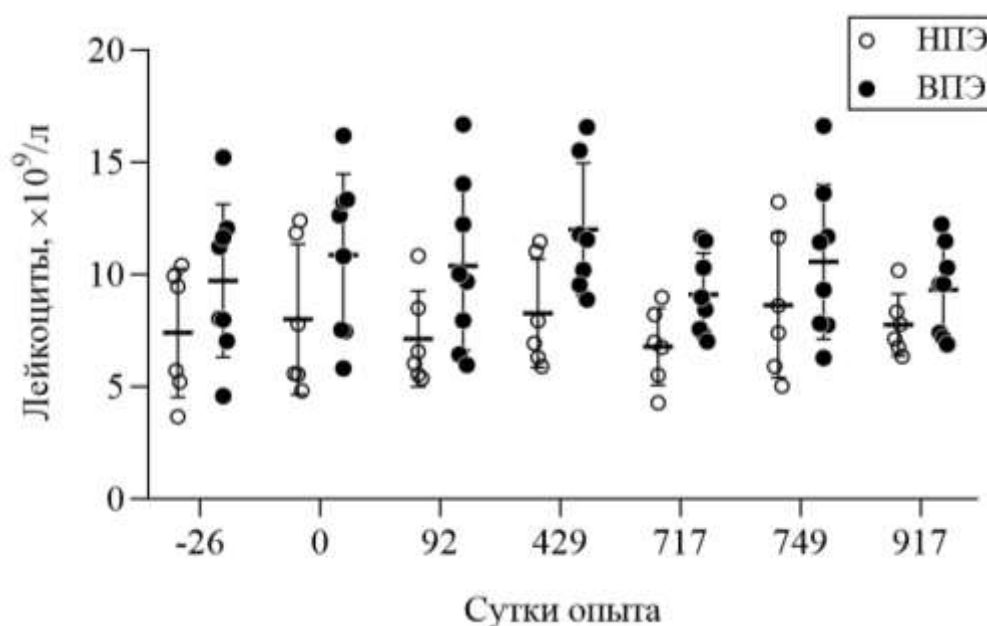


Рисунок 3 – Содержание лейкоцитов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола. НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола

При этом в лейкоцитарной формуле отмечались динамические сдвиги: исходные межгрупповые различия по доле лимфоцитов и нейтрофилов к завершению наблюдения нивелировались (Рисунки 4, 5).

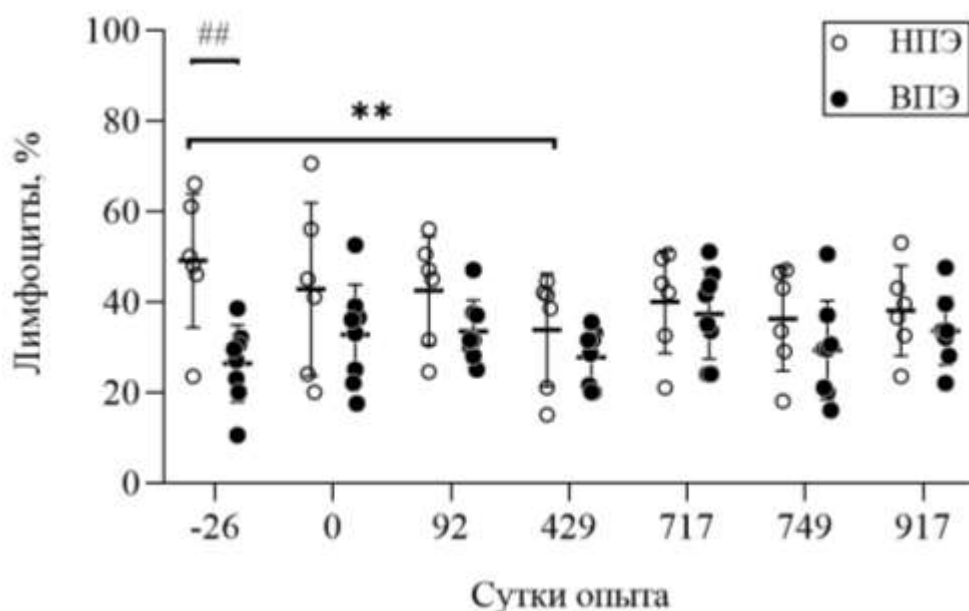


Рисунок 4 – Содержание лимфоцитов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола. НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола, ** – $p < 0,01$ при сравнении внутри группы, ## – $p < 0,01$ при сравнении между группами

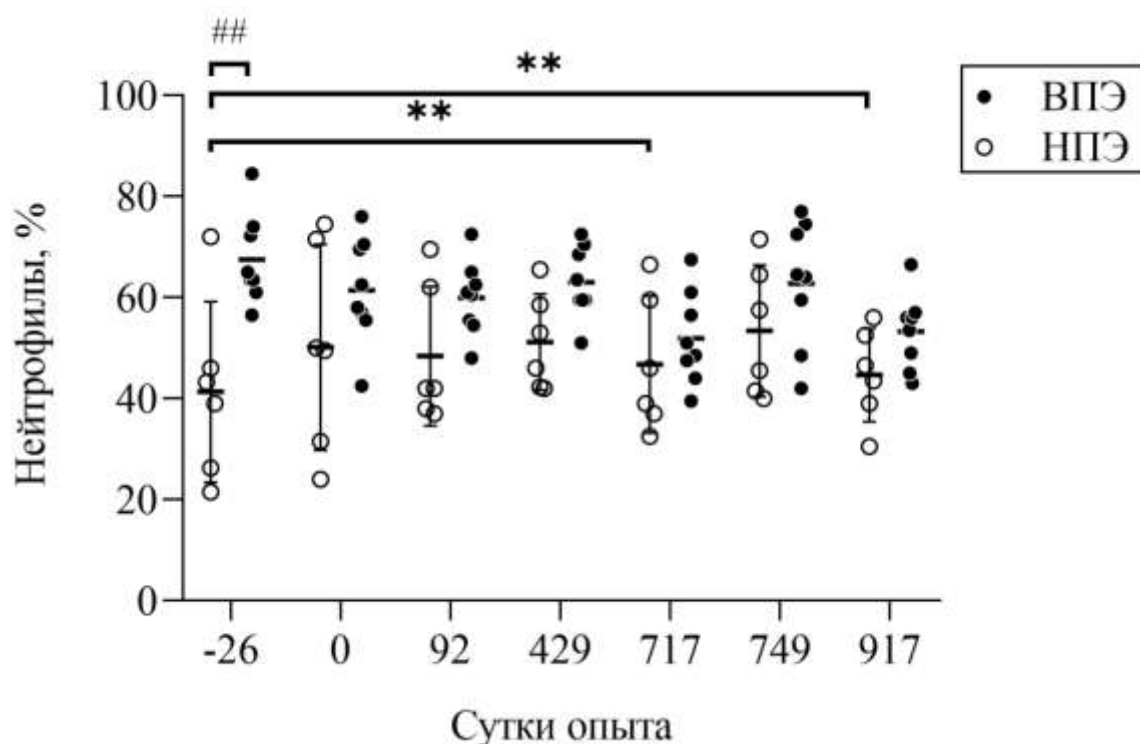


Рисунок 5 – Содержание нейтрофилов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола, НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола, ** – $p < 0,01$ при сравнении внутри группы, ## – $p < 0,01$ при сравнении между группами

К концу эксперимента относительная доля моноцитов в обеих группах увеличилась примерно в два раза по сравнению с исходным уровнем ($p < 0,01$) и составила в среднем более 6 %, превысив литературные референтные значения ($1,6 \pm 1,6$ % для самцов возрастом 3,8–16 лет, согласно Andrade et al., 2004; 0,75–6,15 % для самцов возрастом 4–8 лет, согласно Koo et al., 2019). Отсутствие относительного моноцитоза на 749 сутки (через 29 дней после прекращения доступа к алкоголю) свидетельствует об обратимости этих изменений и их связи с предъявлением алкоголя (Рисунок 6).

В группе ВПЭ на третьи сутки обоих периодов лишения этанола транзиторно снижалось количество эритроцитов, а во втором периоде – также гематокрит. Показатели оставались в пределах физиологических значений и не сопровождались клиническими признаками абстинентного синдрома.

В совокупности выявленные изменения подтверждают системное биологическое действие этанола, но не указывают на выраженное нарушение кроветворения или развитие клинически значимого синдрома отмены.

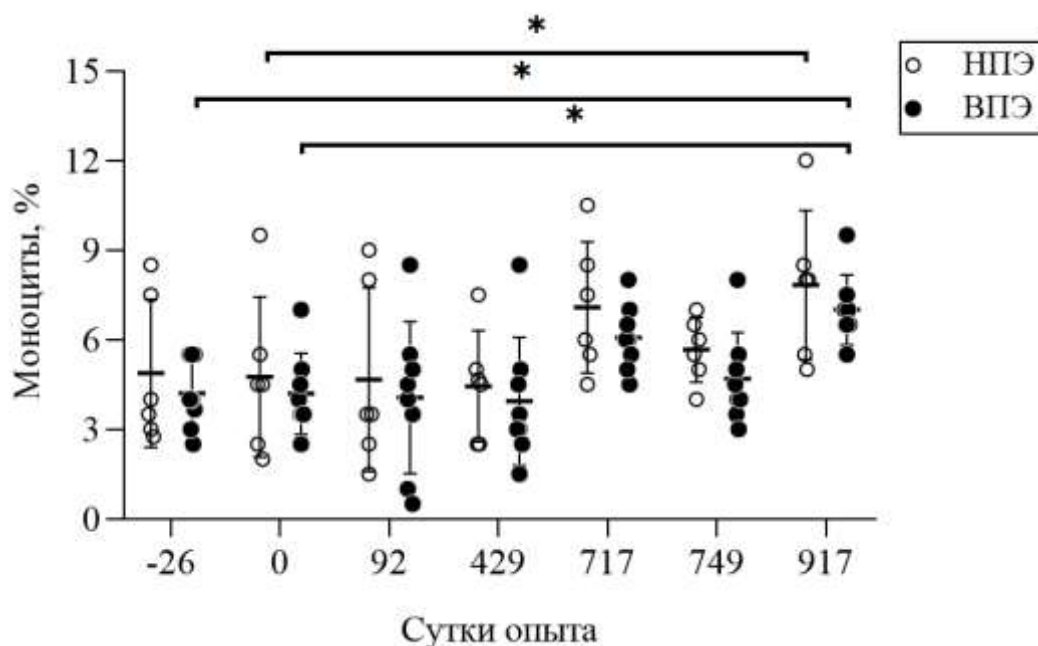


Рисунок 6 – Содержание моноцитов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола. НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола, * – $p < 0,05$ при сравнении внутри группы

Показатели окислительного стресса

Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности каталазы в сыворотке. В обеих подгруппах показатель колебался, но статистически значимо не отличался от фоновых значений адаптационного периода; межгрупповые различия НПЭ и ВПЭ выявлены только в третьем периоде поддержания – на 917 сутки активность каталазы в группе ВПЭ была почти в 8 раз выше, чем в группе НПЭ, при этом внутри группы ВПЭ она не отличалась достоверно от исходного уровня, что указывает на высокую вариабельность и/или адаптационные реакции (Рисунок 7).

На 92-е сутки содержание ТБК-активных продуктов увеличивалось относительно фонового значения, однако в дальнейшем устойчиво снижалось в обеих группах; статистически значимых различий между группами НПЭ и ВПЭ не выявлено (Рисунок 8).

В совокупности динамика уровня ТБК-активных продуктов и активности каталазы свидетельствует о том, что при достигнутом уровне воздействия хроническое потребление этанола не сопровождалось выраженным системным окислительным стрессом.

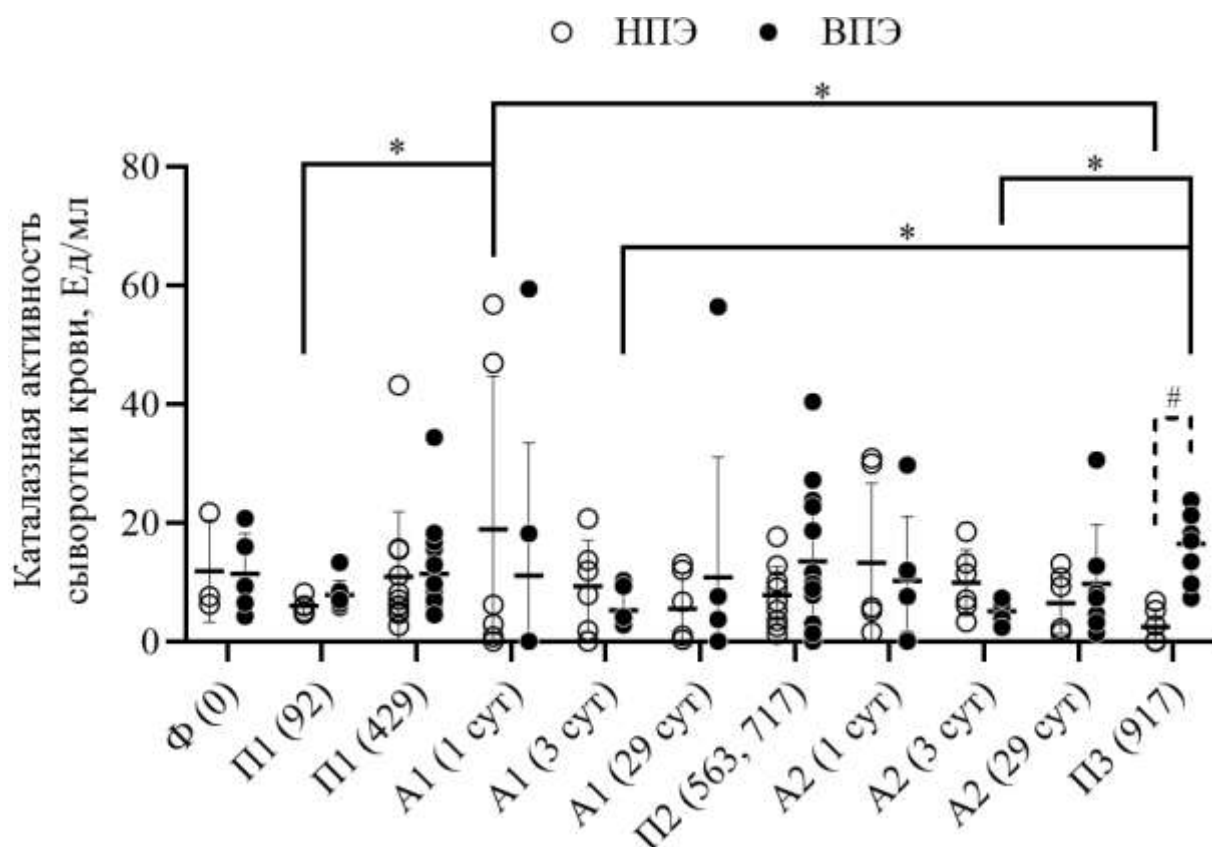


Рисунок 7 – Катазная активность сыворотки крови.

Ф – адаптационный период, П – период поддержания алкогольной мотивации, А – абстинентный период, арабской цифрой у литеры обозначен номер периода, в скобках указаны сутки опыта или периода лишения алкоголя. Данные приведены в виде среднего значения и ошибки среднего. Статистические отличия по тесту Краскела–Уоллиса. # – $p < 0,05$, отличия между группами на данный срок наблюдения. * – $p < 0,05$, отличия внутри групп для разных этапов опыта, сплошная линия для группы НПЭ, пунктирная для группы ВПЭ

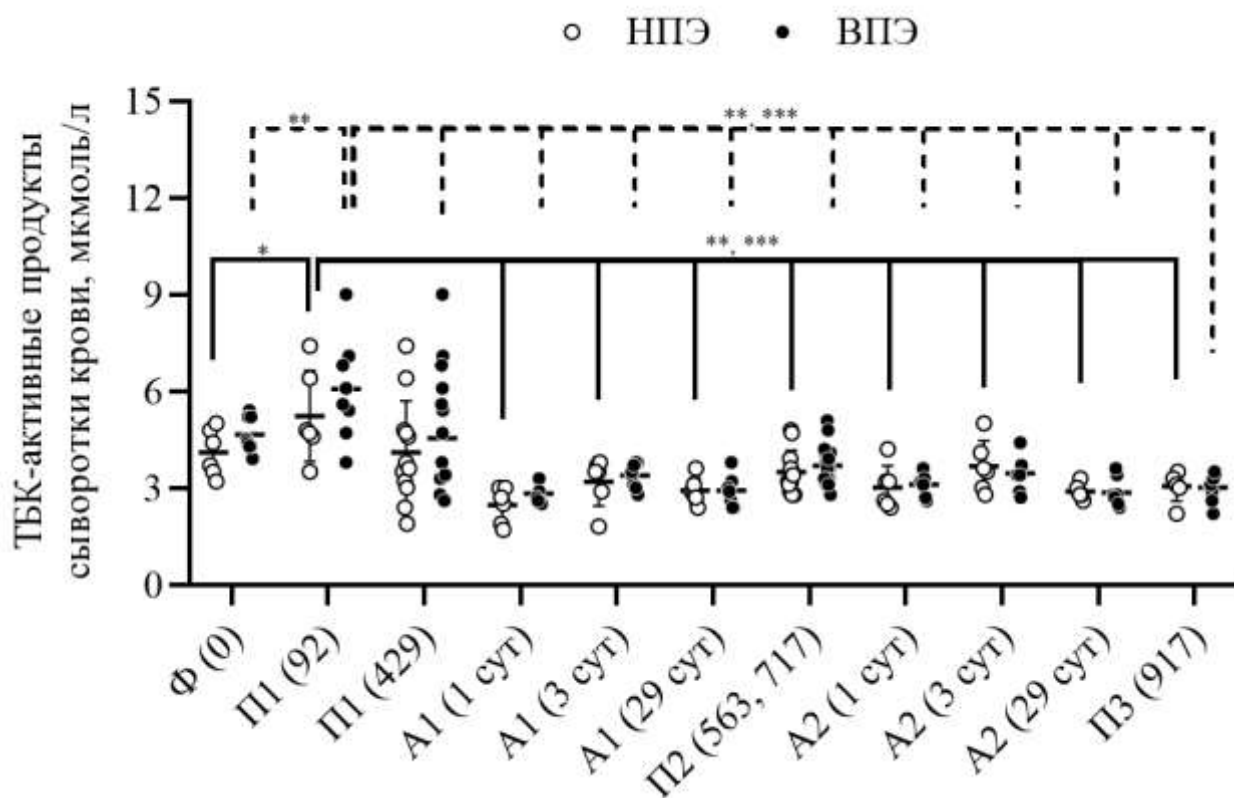


Рисунок 8 – Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови. Ф – адаптационный период, П – период поддержания алкогольной мотивации, А – абстинентный период, арабской цифрой у литеры обозначен номер периода, в скобках указаны сутки опыта или периода лишения алкоголя. Данные приведены в виде среднего значения и ошибки среднего. Статистическая значимость различий по тесту Краскела–Уоллиса от периода адаптации: сплошная линия для группы НПЭ, пунктирная для группы ВПЭ, *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$

Уровень кортизола и ДГЭА-С

У 36 животных уровни кортизола и ДГЭА-С определяли исходно и на 92-е сутки опыта. В общей группе статистически значимых изменений кортизола не выявлено, однако в кватртеле животных с максимальным потреблением его концентрация снижалась ($p = 0,003$); выраженность снижения была связана с уровнем потребления ($r_s = -0,35$, $p = 0,039$). Уровень ДГЭА-С в общей группе снижался ($p = 0,047$), но зависимость выраженности снижения от потребления этанола не выявлена ($r_s = -0,19$, $p = 0,280$). При дальнейшем наблюдении за 14 животными подгрупп НПЭ и ВПЭ уровень кортизола уменьшался в обеих группах до 717-х суток и к 917-м суткам возвращался к фоновым значениям.

Такая динамика соответствует перестройке гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и формированию адаптации в условиях длительного эксперимента, однако снижение кортизола является косвенным показателем и не позволяет однозначно судить об уменьшении психоэмоционального стресса или о механизме изменений длины теломер.

Длина теломер

Сравнение образцов ДНК после двухлетнего хранения со свежесыведенной ДНК от сопоставимых по полу, возрасту и условиям содержания животных не выявило статистически значимых различий средней длины теломер: 16 и 17 т.п.о., соответственно ($t(42) = 0,676$; $p = 0,503$).

Данные об абсолютной средней длине теломер у самцов макак резусов с низким и высоким потреблением представлены в таблице 1. К 92-м суткам показатель увеличился в группе НПЭ с $8,0 \pm 0,8$ до $9,3 \pm 1,0$ т.п.о. ($p = 0,0020$), тогда как в группе ВПЭ изменение с $9,0 \pm 0,9$ до $10,0 \pm 0,9$ т.п.о. не достигало статистической значимости ($p = 0,0667$). К 717-м и 917-м суткам увеличение относительно фоновых значений было статистически значимым в обеих группах. На 749-е сутки, после 29 суток лишения доступа к этанолу, длина теломер значимо не отличалась ни от значений на 717-е, ни от значений на 917-е сутки. К завершению эксперимента у всех животных значения превышали фоновые, при выраженной индивидуальной вариабельности, особенно в группе ВПЭ. Относительная средняя длина теломер изменялась в том же направлении – к 917-м суткам она увеличилась с $1,42 \pm 0,22$ до $3,30 \pm 0,47$ в группе НПЭ ($n=6$) и с $1,53 \pm 0,57$ до $4,61 \pm 0,70$ в группе ВПЭ ($n=8$).

Таблица 1 – Результаты попарного сравнения абсолютной средней длины теломер у макак резусов групп низкого (НПЭ) и высокого (ВПЭ) потребления этанола в различные сроки эксперимента, т.п.о. ($M \pm m$)

Группа	Адаптация (фон)	Поддержание			Лишение алкоголя
	1	2	3	4	5
	–32 сутки	92 сутки	717 сутки	917 сутки	749 сутки (29 суток лишения)
НПЭ ($n=6$)	$8,0 \pm 0,8$	$9,3 \pm 1,0$	$13,0 \pm 1,2$	$16,0 \pm 0,9$	$13,9 \pm 0,8$
Значимость различий	–	$P_{1-2} = 0,0020$	$P_{1-3} = 0,0008$ $P_{2-3} = 0,0048$	$P_{1-4} < 0,0001$ $P_{2-4} < 0,0001$ $P_{3-4} = 0,0034$	$P_{1-5} = 0,0006$ $P_{2-5} = 0,0011$ $P_{3-5} = 0,7739$ $P_{4-5} = 0,1187$
ВПЭ ($n=8$)	$9,0 \pm 0,9$	$10,0 \pm 0,9$	$14,9 \pm 2,0$	$18,2 \pm 2,1$	$16,0 \pm 2,1$
Значимость различий	–	$P_{1-2} = 0,0667$	$P_{1-3} = 0,0090$ $P_{2-3} = 0,0207$	$P_{1-4} = 0,0010$ $P_{2-4} = 0,0022$ $P_{3-4} = 0,0181$	$P_{1-5} = 0,0059$ $P_{2-5} = 0,0128$ $P_{3-5} = 0,2686$ $P_{4-5} = 0,0842$

Индивидуальные траектории изменения абсолютной средней длины теломер представлены на рисунке 9. У всех животных обеих групп к 917-м суткам опыта значения показателя превышали фоновые. Вместе с тем величина изменения длины теломер существенно варьировала между животными, особенно в группе ВПЭ.

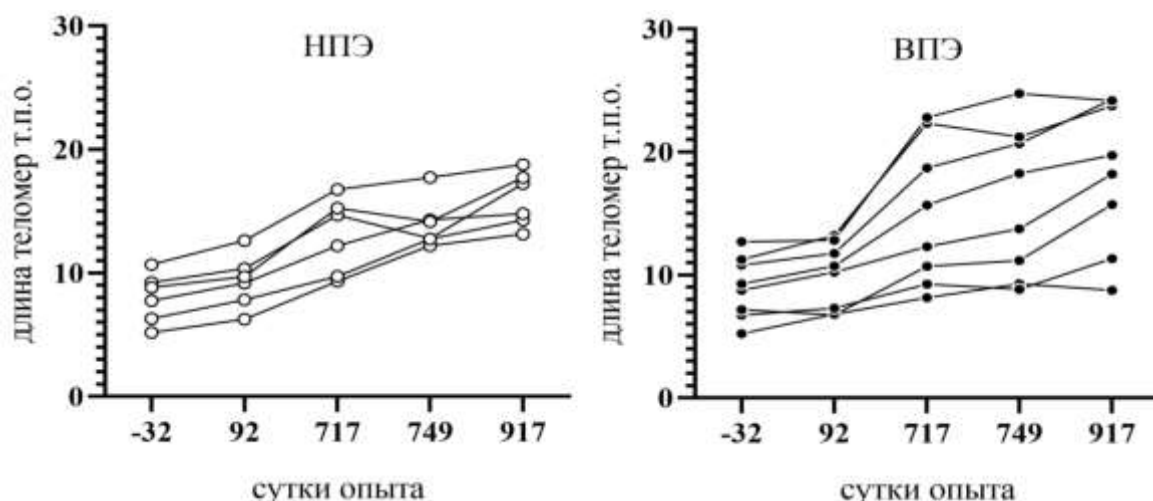


Рисунок 9 – Индивидуальная динамика абсолютной средней длины теломер лейкоцитов макак резусов в ходе эксперимента: а – группа низкого потребления этанола (НПЭ); б – группа высокого потребления этанола (ВПЭ)

Результаты нашего исследования не подтверждают ассоциацию умеренного потребления алкоголя с укорочением теломер при достигнутых в использованной модели уровне и длительности экспозиции этанола. Однако полученный результат не свидетельствует о защитном или удлиняющем теломеры действии этанола, так как изменение наблюдали в группах с разным уровнем потребления.

Перевод самцов яванских макак из группового содержания на индивидуальное содержание в условиях изоляции сопровождался выраженным снижением длины теломер лейкоцитов: при групповом содержании медианные значения оставались относительно высокими, тогда как через 60 дней изоляции у большинства животных отмечалось заметное укорочение (Рисунок 10).

Парный t-критерий подтвердил значимое укорочение теломер после 60 дней изоляции ($t = 3,657$; $df = 9$; $p = 0,0053$). Среднее изменение составило $-5,5$ т.п.о. (95 % доверительный интервал от $-8,97$ до $-2,11$ т.п.о.); частичный эта-квадрат $\eta^2 = 0,598$ соответствует крупному эффекту. Корреляция между значениями в паре составила $r = 0,643$ ($p = 0,045$, двусторонний критерий). Таким образом, 60 дней изолированного содержания сопровождались статистически значимым сокращением длины теломер лейкоцитов у животных, ранее содержавшихся в стабильных группах.

Полученные данные позволяют рассматривать изменение условий содержания как один из факторов, способствовавших формированию относительно низких исходных значений длины теломер в основном эксперименте. Первый забор крови в нем выполняли уже после перевода животных на индивидуальное содержание; данные до перевода отсутствовали. Переход одновременно включал разрыв устойчивых социальных связей и изменение пространственных условий, поэтому вклад отдельных компонентов воздействия не разграничивался. Различие видов макак не позволяет проводить прямое количественное сопоставление результатов основного и дополнительного экспериментов.

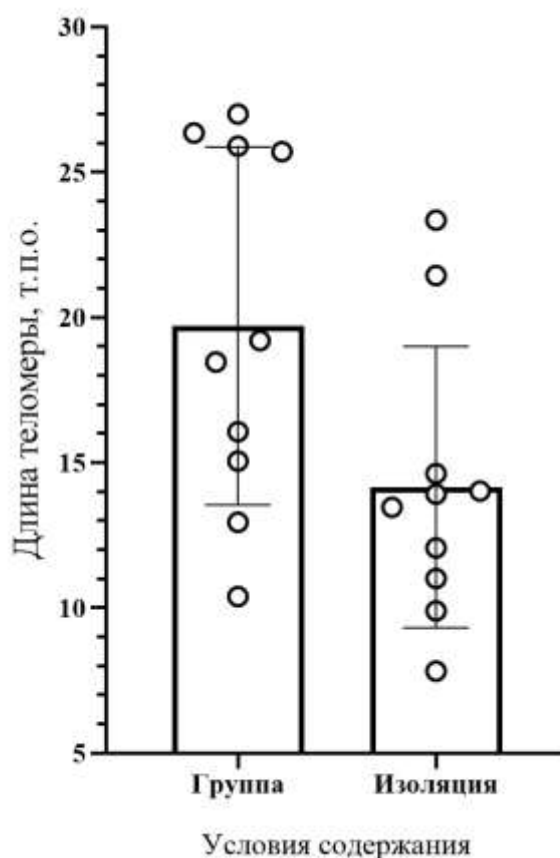


Рисунок 10 – Длина теломер лейкоцитов у животных при групповом содержании и спустя 60 дней социальной изоляции ($t = 3,657$; $df = 9$; $p = 0,0053$)

Данные о средней длине теломер лейкоцитов макак резусов разных возрастов представлены в таблице 2 и на рисунке 11. Статистически значимых различий между возрастными группами не выявлено. При этом отмечалась выраженная индивидуальная вариабельность, сопоставимая во всех группах. Корреляционный анализ также не выявил статистически значимой зависимости длины теломер от возраста ни у самцов ($r = -0,28$, $p = 0,062$), ни у самок макак резусов ($r = 0,016$, $p = 0,920$).

Таким образом, в исследованном возрастном диапазоне межиндивидуальная вариабельность длины теломер была выраженнее возрастной тенденции; поперечный дизайн исследования не позволяет оценить индивидуальную скорость укорочения теломер и не исключает возрастного укорочения в более позднем возрасте или при иных условиях содержания.

Таблица 2 – Абсолютная средняя длина теломер лейкоцитов крови у макак резусов разного возраста, т.п.о. ($M \pm m$)

Пол		Возрастная группа					Всего
		1	2	3	4	5	
		1–3 года	4–9 лет	10–14 лет	15–19 лет	20–24 года	
Самцы	N	10	10	8	10	6	44
	Длина	$19,7 \pm 1,7$	$21,4 \pm 1,9$	$17,9 \pm 1,4$	$16,8 \pm 1,3$	$17,1 \pm 2,3$	$18,7 \pm 0,8$
Значимость различий		–	$P_{1-2}=0,999$	$P_{1-3}=0,999$ $P_{2-3}=0,897$	$P_{1-4}=0,953$ $P_{2-4}=0,554$ $P_{3-4}>0,999$	$P_{1-5}=0,992$ $P_{2-5}=0,804$ $P_{3-5}>0,999$ $P_{4-5}>0,999$	–
Самки	N	9	10	10	9	3	41
	Длина	$17,0 \pm 1,6$	$17,1 \pm 2,4$	$21,8 \pm 2,6$	$17,0 \pm 1,4$	$18,0 \pm 2,3$	$18,2 \pm 1,0$
Значимость различий		–	$P_{1-2}>0,999$	$P_{1-3}=0,525$ $P_{2-3}=0,529$	$P_{1-4}>0,999$ $P_{2-4}>0,999$ $P_{3-4}=0,525$	$P_{1-5}>0,999$ $P_{2-5}>0,999$ $P_{3-5}=0,979$ $P_{4-5}>0,999$	$P_{\text{самцы-самки}} = 0,762$

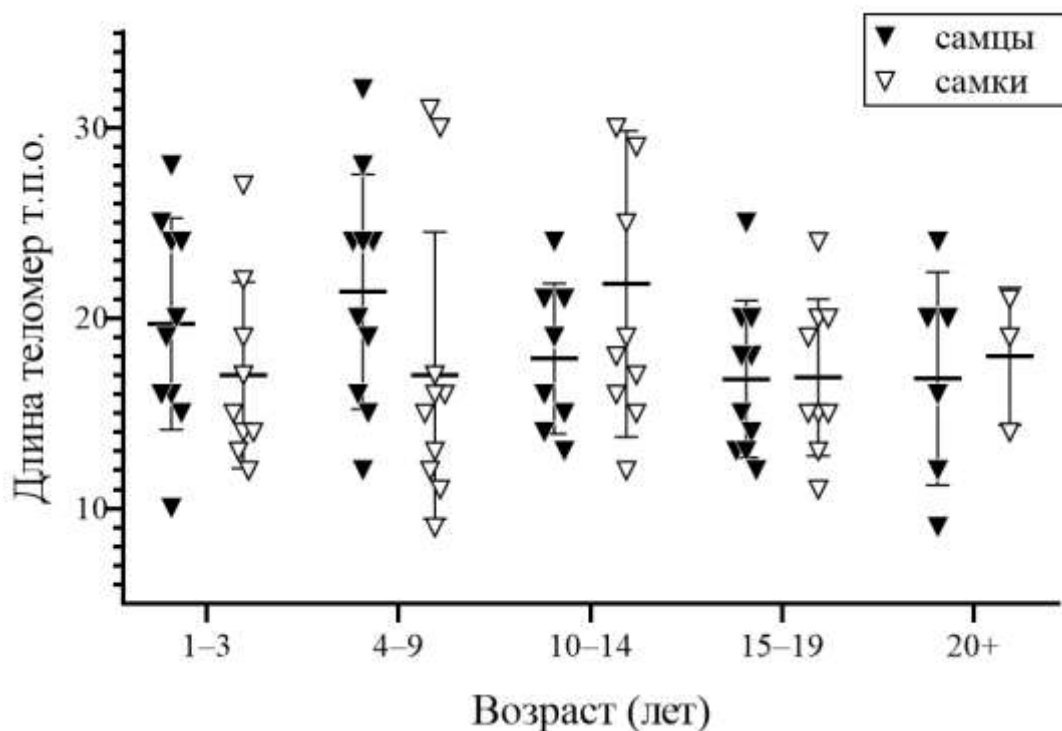


Рисунок 11 – Длина теломер лейкоцитов макак резусов разных возрастных групп. Представлены индивидуальные значения и средние $\pm$ SD для самцов и самок. Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния возраста ($p = 0,553$), пола ($p = 0,762$) или их взаимодействия ($p = 0,238$)

Заключение

Использование модели хронического добровольного потребления этанола у лабораторных приматов позволило непосредственно регистрировать уровень алкогольной экспозиции и оценить динамику показателей у одних и тех же животных. В группе ВПЭ медиана потребления достигала 3,03 г/кг в сутки, а содержание этанола в крови – 160 мг/дл. Биологическая эффективность модели проявлялась снижением массы тела, нарушением липидного обмена, повышением активности гамма-глутамилтранспептидазы и содержания билирубина, соответствующим формированию биохимических признаков холестатического синдрома, а также изменениями лейкоцитарного профиля и нейроэндокринного ответа гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. При этом выраженного цитолитического синдрома и структурных изменений печени и сердца не выявлено.

Изменения клеточного состава крови имели преимущественно функциональный и обратимый характер. Абсолютное количество лейкоцитов оставалось стабильным, тогда как к завершению эксперимента в обеих группах увеличивалась относительная доля моноцитов. Транзиторное снижение количества эритроцитов и гематокрита в группе ВПЭ в период лишения этанола не сопровождалось выходом показателей за пределы физиологического диапазона. Первоначальное повышение содержания ТБК-активных продуктов также имело транзиторный характер, а активность каталазы не демонстрировала последовательного отклонения от исходного уровня. Следовательно, хроническое потребление этанола при достигнутой экспозиции не сопровождалось развитием выраженного системного окислительного стресса.

Основным результатом исследования стало отсутствие уменьшения средней длины теломер лейкоцитов при хроническом потреблении этанола продолжительностью до 917 суток. Укорочения теломер не выявлено ни у животных с низким, ни у животных с высоким уровнем потребления. Лишение доступа к этанолу также не сопровождалось значимым изменением показателя. К завершению наблюдения средняя длина теломер превышала исходные значения и находилась в диапазоне, установленном у интактных животных. В поперечном исследовании интактных макаков резусов статистически значимых возрастных и половых различий длины теломер не выявлено.

Полученные данные не означают отсутствия патогенного действия этанола и не исключают укорочения теломер при более высокой экспозиции, развитии выраженного окислительного стресса, воспаления или органной патологии. Выявленные функционально-метаболические изменения подтверждают наличие системного биологического действия этанола, не сопровождавшегося уменьшением длины теломер на исследованном этапе патологического процесса.

Дополнительное исследование показало, что перевод животных из устойчивых социальных групп на индивидуальное содержание сопровождается быстрым уменьшением средней длины теломер. За 60 суток показатель снизился в среднем на 5,5 т.п.о. Последующее увеличение средней длины теломер в основном эксперименте может отражать адаптацию животных к новым условиям

содержания и восстановление показателя после первоначального снижения. Наблюдавшаяся динамика не является доказательством непосредственного удлиняющего или защитного действия этанола. Активность теломеразы, альтернативные механизмы удлинения и репарация теломерной ДНК непосредственно не исследовались.

Таким образом, хроническое добровольное потребление этанола вызывало системные патофизиологические изменения, но в исследованном диапазоне экспозиции не сопровождалось уменьшением длины теломер. В то же время перевод животных из стабильных социальных групп в условия индивидуального содержания являлся самостоятельным стрессовым воздействием, способным вызвать выраженное укорочение теломер. Полученные результаты свидетельствуют о неодновременности развития отдельных звеньев алкоголь-индуцированной патологии и показывают, что укорочение теломер нельзя рассматривать как обязательное непосредственное следствие алкогольной экспозиции. При интерпретации длины теломер необходимо учитывать исходное состояние организма, последовательность воздействий, условия содержания и сопутствующие соматические и психосоциальные факторы.

Перспективы дальнейшей разработки темы.

Перспективно расширение спектра исследуемых показателей, включая активность теломеразы, экспрессию генов, участвующих в регуляции длины теломер, маркеры повреждения и репарации ДНК, состояние митохондрий и другие показатели антиоксидантной защиты. Комплексная оценка этих параметров позволит уточнить механизмы восстановления длины теломер, наблюдавшегося в опыте с хроническим воздействием этанола.

Отдельное значение имеет определение длины теломер в различных субпопуляциях лейкоцитов и клетках-предшественниках костного мозга, что позволит разграничить изменения внутри клеток и сдвиги среднего показателя, обусловленные перераспределением клеточных популяций.

Интерес представляет продольное исследование при больших уровнях, других режимах и продолжительности потребления этанола, а также в периоды лишения доступа к нему. Увеличение длительности наблюдения позволит определить, сохраняется ли отсутствие укорочения теломер при прогрессировании метаболических и органических нарушений и развитии более выраженных проявлений хронической алкогольной интоксикации.

Перспективным направлением является дальнейшее изучение влияния психосоциального стресса на длину теломер у приматов, включая временную динамику стресс-ассоциированного укорочения и возможность восстановления показателя при адаптации к изменившимся условиям содержания.

ВЫВОДЫ

1. В модели со свободным выбором между раствором этанола и водой у самцов макак резусов формируется различный индивидуальный уровень потребления алкоголя (медиана от 0,14 до 3,03 г/кг массы тела/сут. для первого периода поддержания), который коррелирует с концентрацией этанола в крови ($r = 0,62$, $p < 0,001$). Наблюдается тенденция к увеличению потребления алкоголя со временем в группах как низкого, так и высокого уровня потребления этанола.

2. Изменение условий содержания с группового на изолированное является стрессогенным событием, которое сопровождается значительным укорочением теломер лейкоцитов с $19,7 \pm 1,9$ т.п.о. до $14,2 \pm 1,5$ т.п.о. ($p = 0,0053$).

3. При потреблении этанола самцами макак резусов в дозе менее 3,03 г/кг в сутки значимый системный окислительный стресс не развивается и отсутствуют значимые изменения абсолютного числа лейкоцитов, однако в обеих группах (низкого и высокого потребления) наблюдается двукратное повышение относительного числа моноцитов к концу эксперимента ($p < 0,01$) по сравнению с исходными значениями.

4. Хроническое потребление алкоголя самцами макак резусов в условиях свободного выбора с водой при медиане до 3,03 г/кг/сут., уровне этанола в крови до 160 мг/дл и длительности экспозиции до 917 сут. не сопровождается укорочением теломер лейкоцитов по сравнению с фоновым значением. К концу опыта наблюдалось увеличение длины теломер до уровня среднего значения, регистрируемого у интактных самцов макак резусов: в группе ВПЭ – с $9,0 \pm 0,9$ до $18,2 \pm 2,1$ т.п.о. ($p = 0,001$), в группе НПЭ – с $8,0 \pm 0,8$ до $16,0 \pm 0,9$ т.п.о. ($p < 0,0001$).

5. При поперечном исследовании абсолютная средняя длина теломер лейкоцитов крови интактных макак резусов в возрасте от 1 до 24 лет составила в среднем $18,7 \pm 0,8$ т.п.о. у самцов и $18,2 \pm 1,0$ т.п.о. у самок и в указанном диапазоне не зависела от возраста ($p = 0,553$) и пола ($p = 0,762$), что свидетельствует об отсутствии влияния изменения возраста животных при длительной алкоголизации на показатель средней длины теломер.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Среднюю длину теломер лейкоцитов крови при хроническом воздействии этанола следует оценивать при выполнении комплексного исследования с учетом показателей окислительного стресса, метаболических и воспалительных изменений, а также клеточного состава периферической крови. Изолированная интерпретация данного показателя может быть недостаточно информативной, поскольку его динамика определяется совокупным воздействием различных повреждающих факторов и характером адаптационно-компенсаторных реакций организма.

При изучении изменений длины теломер предпочтительно использовать продольный дизайн с повторными измерениями у одних и тех же животных. Такой подход позволяет учитывать индивидуальную вариабельность исходных значений, особенно при небольших размерах выборки, и разграничивать влияние

исследуемого воздействия, исходного функционального состояния организма и адаптации к условиям длительного эксперимента.

При планировании и интерпретации молекулярно-генетических исследований на лабораторных приматах необходимо учитывать условия содержания животных и последовательность их изменения. Разрыв устойчивых социальных связей и перевод на индивидуальное содержание могут выступать самостоятельными стрессовыми факторами, сопровождаться выраженным изменением длины теломер и искажать оценку действия исследуемого этиологического фактора.

Модель добровольного потребления этанола в условиях свободного выбора с водой может быть использована для изучения последовательности формирования алкоголь-ассоциированных функциональных, метаболических и молекулярных нарушений, а также для оценки эффективности профилактических и терапевтических воздействий.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

36B4 – ген рибосомального белка P0 (однокопийный контрольный ген для ПЦР)

ВПЭ – высокое потребление этанола

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

НПЭ – низкое потребление этанола

ПЦР (PCR) – полимеразная цепная реакция

ТБК – тиобарбитуровая кислота

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах и изданиях, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ:

1. Систематический обзор исследований по ассоциации потребления алкоголя и длины теломер у людей / Панченко Ан.В., Агумава А.А., Павлова Л.Е., Панченко Ал.В., **Тимина М.Ф.** // Экология человека. – 2022. – Т. 29, № 12. – С. 831–854.

2. Некоторые показатели системы крови и окислительного стресса при хроническом потреблении алкоголя макаками-резус в модели со свободным выбором / **Тимина М.Ф.**, Киргинцев Р.М., Агумава А.А., Павлова Л.Е., Черкашина Е.В., Панченко Ан.В., Панченко Ал.В. // Вопросы наркологии. – 2023. – Т. 35, №2. – С. 37–51.

3. Изменение длины теломер в лейкоцитах у самцов макак резусов разного возраста / **Тимина М.Ф.**, Павлова Л.Е., Киргинцев Р.М., Агумава А.А. // Успехи геронтологии. – 2023. – Т. 36, № 6. – С. 859-863.

4. Длина теломер у макак-резус при добровольном хроническом потреблении этанола / **Тимина М.Ф.**, Киргинцев Р.М., Павлова Л.Е., Агумава А.А., Панченко А.В. // Молекулярная медицина. – 2024. – Т. 22, № 5. – С. 48-53.

Тезисы докладов в материалах конференций:

5. Молекулярно-генетические аспекты теломерной теории старения / Агумава А.А., Пирожок А.В., Рыбалко А.Е., Шляпников С.М., **Тимина М.Ф.**, Панченко А.В., Панченко А.В., Афанасова Я.О., Павлова Л.Е. // Международная научная конференция «Инновационные исследования в биологии и медицине» Сочи, 2020. – С. 12-13.

6. Разработка ПЦР тест-системы для определения уровня экспрессии теломеразы в клетках макак-резусов / Пирожок А.В., **Тимина М.Ф.**, Панченко А.В., Павлова Л.Е., Агумава А.А. // XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 2020. Москва. Россия. – С. 171.

7. Высшие приматы как трансляционная модель для изучения психопатологий человека / **Тимина М.Ф.**, Панченко А.В., Агумава А.А. // В сборнике: Молодые ученые в медицине и биологии. Электронный ресурс. 2019. – С. 198-204.

8. Длина теломер ДНК клеток крови самцов макак-резус разных возрастных групп / **Тимина М.Ф.**, Павлова Л.Е., Киргинцев Р.М., Агумава А.А. // XXIII Зимняя молодежная школа по биофизике и молекулярной биологии. Гатчина, 2024. – С. 183-184.

9. Средняя абсолютная длина теломер макак-резус разного возраста / **Тимина М.Ф.**, Павлова Л.Е., Агумава А.А., Панченко А.В. // «Успехи Геронтологии». – Т.37, №.5. – 2024. – С. 656.