

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

На правах рукописи

Тими́на Мари́я Филипповна

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

3. 3. 3 - Патологическая физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
д-р мед. наук Панченко Андрей Владимирович

СОЧИ - 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
Актуальность темы исследования.....	5
Степень разработанности темы исследования.....	8
Цель исследования.....	11
Задачи исследования.....	11
Научная новизна работы.....	12
Теоретическая и практическая значимость.....	12
Методология и методы исследования.....	13
Основные положения, выносимые на защиту.....	14
Степень достоверности и апробация работы.....	15
Личный вклад автора.....	16
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	16
Объем и структура диссертации.....	17
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1 Теломеры, строение и функции.....	18
1.2 Проблема укорочения теломер и ее биологическое значение.....	20
1.3 Механизмы контроля и изменения длины теломер в клетке.....	22
1.3.1 Теломераза.....	22
1.3.2 Теломерная РНК.....	24
1.3.3 Эпигенетическое влияние.....	25
1.4 Различия в длине теломер разных типов клеток, включая лейкоциты.....	26
1.4.1 Проблемы репарации и концевая недорепликация.....	27
1.4.2 Окислительный стресс как важный фактор укорочения длины теломер.....	29
1.5 Алкоголь и механизмы регуляции длины теломер.....	29
1.5.1 Алкоголь и окислительный стресс.....	30
1.5.2 Исследования алкоголя и длины теломер на клеточном уровне и в экспериментах in vivo.....	33
1.6 Влияние потребления алкоголя на длину теломер в клинических исследованиях.....	37
1.7 Методические проблемы определения длины теломер.....	50
1.7.1 Методы определения длины теломер.....	50
1.7.2 Этические и биологические проблемы определения длины теломер у людей при воздействии алкоголя.....	54

Закключение по обзору	55
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	58
2.1 Животные	58
2.2 Моделирование хронического потребления алкоголя	60
2.3 Взятие крови и гематологический анализ	62
2.4 Ультразвуковое исследование	62
2.5 Методы ПЦР	63
2.5.1 Оценка влияния хранения выделенной ДНК на определение длины теломер в ней	68
2.6 Биохимические исследования сыворотки крови	68
2.7 Статистическая обработка результатов	69
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	70
3.1 Результаты использования статистических критериев проверки нормальности распределения зависимых переменных.....	70
3.2 Потребление этанола и соматические изменения	72
3.3 Результаты гематологического анализа.....	78
3.4 Показатели окислительного стресса	82
3.5 Уровень кортизола и ДГЭА-С	85
3.6 Длина теломер	88
3.6.1 Оценка влияния хранения выделенной ДНК	88
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	96
4.1 Соматические и биохимические изменения при хроническом потреблении этанола.....	96
4.2 Влияние потребления этанола на длину теломер	98
4.3 Лейкоцитарный профиль и влияние алкоголя на состав крови	103
4.4 Влияние возраста на длину теломер	107
4.5 Методические аспекты вариабельности определения длины теломер	109
4.6 Окислительный стресс и хроническое потребление этанола	113
4.7 Влияние условий содержания экспериментальных животных на изменения длины теломер	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
ВЫВОДЫ	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	124
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	125
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	148
БЛАГОДАРНОСТИ	150

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Медицинские и социальные проблемы, связанные со злоупотреблением алкоголем и алкоголизмом, несмотря на различные меры по профилактике и борьбе с ними, остаются высоко актуальными [1]. Длительное воздействие этанола на организм часто приводит к формированию физической зависимости, проявляющейся эпизодами непрерывного потребления алкоголя (запой), компульсивным стремлением к его употреблению и развитием абстинентного синдрома и патологических изменений многих органов и систем организма [2]. Хроническое потребление этанола ведет к формированию алкогольной болезни печени и сопутствующих иммунологических нарушений [3]. В частности, под действием этанола наблюдается чрезмерная активация клеток врожденного иммунного ответа как в периферической крови, так и в печени. Это связано с тем, что из-за повышенной проницаемости кишечной стенки и ослабленной барьерной функции печени в системный кровоток проникает большее количество бактериальных токсинов [4]. Одновременно с этим хроническое употребление алкоголя приводит к снижению общего количества лимфоцитов (лимфопении), сопровождающемуся повышением числа активированных Т-лимфоцитов в кровеносном русле [5]. Алкоголь воздействует на центральную нервную систему, вызывая нейродегенерацию с последующими когнитивными и поведенческими нарушениями, но механизмы, лежащие в основе этих процессов, остаются неясными [6]. Этанол обладает выраженным кардиотоксическим действием, в частности ведет к развитию субклинической дисфункции левого желудочка [7]. Употребление алкоголя до и во время беременности может привести к аномалиям развития плода, включая нарушение функции миокарда и повышенный риск сердечных заболеваний в более позднем возрасте [8]. Подобные неблагоприятные эффекты привели к разработке пороговых значений потребления алкоголя в зависимости от региона, пола и возраста, которые оказывают наименьший риск для здоровья. Однако оценка канцерогенного риска, связанного с потреблением

алкоголя, указывает на то, что нет определенного порога, при достижении которого канцерогенное воздействие алкоголя начинает проявляться в организме человека. Таким образом, невозможно определить некий безопасный уровень потребления алкоголя выше нулевого [9,10]. Кроме таких явных вредных последствий, согласно эпидемиологическим исследованиям, в организме под действием этанола могут происходить и менее заметные изменения, в частности, укорочение теломер на клеточном уровне.

Теломеры представляют собой специализированные элементы, расположенные на терминальных участках линейных хромосом эукариот, и играют критическую роль в поддержании структурной и функциональной стабильности генома [11]. Их структура включает tandemные повторы ДНК, ассоциированные белки, а также теломерные некодирующие РНК [12]. Одним из приоритетных направлений современной клеточной биологии остается исследование процессов укорочения теломер, которое может происходить как в ходе митотического деления, так и при нарушении репаративных механизмов. Укорочение теломер ведет к утрате клеточной способности к делению и запускает репликативное старение, описанное в рамках предела Хейфлика [13]. Длина теломер отрицательно коррелирует с возрастом (теломерная гипотеза старения), развитием опухолей и повышенным риском возникновения различных патологий, включая заболевания сердечно-сосудистой системы [14–16]. Однако часть научных данных не подтверждает наличие устойчивой связи между длиной теломер, вероятностью развития ряда заболеваний и общей продолжительностью жизни [16,17].

Известно, что потребление высоких разовых доз алкоголя (binge drinking) ассоциировано как с окислительным стрессом, так и с меньшей длиной теломер. Однако среди исследований наблюдается большая несогласованность, связанная, в частности, с методическими сложностями определения точного уровня потребления с использованием анкетирования [18]. В проведенном нами систематическом обзоре исследований у людей по проблеме ассоциации потребления алкоголя с длиной теломер установлена необходимость

дополнительного изучения этого вопроса. Так, нерешенным является определение уровня потребления или дозы воздействия этанола, при которых возможно изменение длины теломер клетки [19]. Совокупность эпидемиологических и клинических данных свидетельствует о том, что относительно короткие теломеры и ускоренное истощение теломер связаны с факторами, которые определяют старение и болезни старения у людей [20]. Хроническое воздействие алкоголя может вносить вклад в этот механизм формирования заболеваемости.

В клинических исследованиях оценка влияния длительного потребления алкоголя на длину теломер обычно ограничена дизайном работы: сравнивают людей, употребляющих алкоголь, с теми, кто никогда его не употреблял. Однако такие группы трудно полностью сопоставить по другим факторам, которые могут влиять на длину теломер. Проспективные исследования также, как правило, охватывают лишь ограниченный период употребления алкоголя. Предъявление алкоголя здоровым лицам, ранее не употреблявшим его, не является приемлемым с этической точки зрения, так как создает определенные риски для здоровья испытуемых. При этом длительные многолетние наблюдения не могут быть выполнены на моделях у грызунов из-за ограниченной продолжительности их жизни. Длина теломер и их истощение у обезьян (высших приматов) могут рассматриваться как точный шаблон для понимания биологии теломер у людей. Важным аспектом является возможность провести моделирование у обезьян в рамках парадигмы свободного выбора между алкоголем и водой, при которой происходит формирование хронического употребления алкоголя у людей.

Таким образом, представляется крайне актуальным провести оценку длины теломер на модели хронического потребления этанола у обезьян вида макака резус (*Macaca mulatta*) в зависимости от уровня и длительности потребления, показателей окислительного стресса в периоды потребления этанола и лишения доступа к нему.

Степень разработанности темы исследования

В культивируемых клетках теломеры обычно утрачивают 50-200 пар оснований (п.о.) во время каждого цикла репликации ДНК, а теломеры лейкоцитов у взрослых людей укорачиваются со скоростью ~ 25 п.о. в год. Укорочение теломер со временем приводит к критически короткой длине ~ 5 т.п.о. (тысяч пар оснований) и естественным образом обуславливает сенесцентное состояние или апоптоз [21].

Несмотря на то, что на моделях *in vitro* и *in vivo* были получены убедительные доказательства того, что длина теломер отражает уровни как клеточного старения, так и оксидативного стресса, связанного с хроническими заболеваниями, эпидемиологические и клинические данные гораздо менее убедительны [22]. Подобное несоответствие, по крайней мере частично, может объясняться различиями в применяемых методах измерения длины теломер и подходах к статистическому моделированию, а также вариативностью между исследуемыми популяциями. Укорочение теломер – сложный биологический феномен, механизмы которого остаются не до конца установленными. В частности, остается открытым вопрос, следует ли рассматривать укорочение теломер как отражение внутреннего клеточного механизма счетчика делений (митотических часов) или же как индикатор воздействия различных стрессовых факторов на организм [23,24].

Этанол – это небольшая амфифильная молекула (с полярными и неполярными областями), которая может взаимодействовать с водой и липидами. Она оказывает значительное воздействие на клетки, взаимодействуя с липидами клеточной мембраны и изменяя их конформацию. Это приводит к повышению проницаемости мембран и нарушению ионных градиентов, что в свою очередь дестабилизирует клеточный гомеостаз [25]. Этанол влияет на функции митохондрий, нарушая процессы окислительного фосфорилирования и снижая выработку АТФ, что приводит к энергетическому дефициту в клетке [26]. Кроме того, метаболизм этанола через ферментативные системы (например,

алкогольдегидрогеназу и альдегиддегидрогеназу) вызывает образование активных форм кислорода (АФК), что приводит к оксидативному стрессу. Оксидативный стресс приводит к повреждению липидов мембран, белков и нуклеиновых кислот, что способствует нарушению клеточной функции, апоптозу и некрозу [27]. Выявлено достоверное повышение как каталазной активности, так и супероксиддисмутазы в плазме крови больных в состоянии алкогольной абстиненции, а также активности каталазы в сыворотке крови больных в состоянии постабстинентного синдрома по сравнению с показателями здоровых лиц [28,29]. Окислительный стресс является одним из ключевых факторов, способствующих укорочению теломер, особенно в лейкоцитах и других активно делящихся клетках, как при старении, так и при хронических заболеваниях. В условиях хронического окислительного стресса в лимфоцитах ускоряется укорочение теломер. Кроме того, окислительное воздействие может провоцировать выход ионов кальция из митохондрий, что инициирует порочный круг, включающий укорочение теломер, митохондриальную дисфункцию, усиленную продукцию АФК и накопление ДНК-повреждений, что в свою очередь усугубляет потерю теломерами длины [30].

В ряде клинических исследований злоупотребление алкоголем и алкогольная зависимость ассоциированы с уменьшением их длины. Однако не вполне ясен характер этой патогенетической связи, т. е. является ли данный эффект результатом прямого действия этанола или он опосредован токсическими эффектами его метаболитов, развитием окислительного стресса, алкогольными органическими и связанными системными метаболическими нарушениями. Нет ответа и на вопрос о наличии порогового условно «безопасного» уровня потребления алкоголя, при котором не происходит укорочения теломер, как и о длительности воздействия [19]. При этом в отношении любого патогенного фактора известно, что его патогенное действие обусловлено силой, длительностью воздействия или их сочетанием.

Экспериментальные исследования связи воздействия этанола с теломерным аппаратом немногочисленны и дают неоднозначные результаты. В культурах

клеток млекопитающих воздействие этанола сопровождалось укорочением теломер, снижением экспрессии TERT или другими нарушениями регуляции теломеразного комплекса, причем характер изменений зависел от типа клеток и длительности экспозиции [31–35]. У дрожжей, напротив, наблюдали удлинение теломер [36], а в экспериментах *in vivo* на рыбах и мышах изменения зависели от поведенческого фенотипа и сопутствующей метаболической нагрузки [37,38]. В целом эти данные подтверждают возможность прямого воздействия этанола на теломерный аппарат, но не позволяют установить единый дозозависимый эффект для целостного организма; длительные исследования на млекопитающих, особенно приматах, практически отсутствуют.

Хотя укорочение теломер является естественным процессом старения, окислительный стресс ускоряет этот процесс, повреждая структуру теломер и нарушая активность теломеразы – фермента, который поддерживает длину теломер [39]. Это приводит к преждевременной клеточной сенесценции, снижению пролиферативного потенциала клеток и ускоренному старению тканей, что играет роль в патогенезе возрастных заболеваний и канцерогенезе [40].

Эпидемиологические данные о связи потребления алкоголя с длиной теломер противоречивы. В ряде исследований, прежде всего среди лиц, злоупотребляющих алкоголем или имеющих алкогольную зависимость, выявляли более короткие теломеры, тогда как в крупных популяционных и проспективных когортах статистически значимой связи между уровнем потребления и исходной длиной либо ее динамикой не обнаруживали [19]. Наряду с этим в отдельных клинических исследованиях показана и положительная ассоциация потребления алкоголя с длиной теломер. Так, в продольном наблюдении за более чем 4000 мужчин и женщин на протяжении 10 лет у 44 % участников описано увеличение средней длины теломер, а в другом исследовании увеличение длины теломер более чем на 5 % за 6 лет наблюдения выявлено у 27 % (510 участников) [19]. При этом направление изменений в этих исследованиях не было связано с уровнем потребления алкоголя.

Таким образом, имеющиеся эпидемиологические данные не позволяют однозначно заключить, что потребление алкоголя само по себе вызывает укорочение или удлинение теломер; расхождения могут быть обусловлены различиями дизайна, характеристик выборок, оценки экспозиции и методов измерения длины теломер.

Цель исследования

Цель диссертационного 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 работы

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 со свободным выбором 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 исследований на лабораторных приматах и при интерпретации их результатов. Эти данные 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 данного диссертационного исследования. Использование макак резусов в

качестве модельного объекта обладает преимуществом благодаря филогенетическому, анатомическому, нейроиммунноэндокринному, поведенческому и социальному сходству с человеком [41], что облегчает задачу адекватной трактовки и переноса результатов с модельного объекта на человека. Для моделирования алкогольной мотивации использован подход со свободным выбором между алкоголем и водой, что позволило исключить влияние стрессового воздействия принудительного введения алкоголя на изучаемые параметры. Кроме того, такой подход позволил выделить животных с разным уровнем алкогольной мотивации, сформированной естественным образом. Работа содержит в себе результаты, полученные с использованием гематологических, биохимических и молекулярно-генетических методов исследования биологического материала животных. Полученные данные обобщены, подвергнуты статистическому анализу и сопоставлены с результатами, описанными в мировой литературе. Таким образом, совокупность примененных методологических подходов позволяет считать полученные результаты 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 и апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на различных специализированных общероссийских и международных научных мероприятиях, включая международную научно-практическую конференцию «Молодые ученые в медицине и биологии» (электронный ресурс, 2019 год); международную научную конференцию «Инновационные исследования в биологии и медицине» (Сочи, 25–27 ноября 2020 года); молодежную научную школу «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 10–13 февраля 2020 года); XXIII Зимнюю молодежную школу по биофизике и молекулярной биологии (Санкт-Петербург, Репино, 26 февраля – 2 марта 2024 года).

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.

Работа поддержана грантом РНФ и КНФ № 22-25-20192 под руководством к.б.н. Агумава Аслана Анзоровича, проект успешно завершен (https://rscf.ru/prjcard_int?22-25-20192).

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).

Все результаты работы являются оригинальными, в тексте рукописи заимствования без указания автора или источника отсутствуют.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно осуществил основную часть экспериментальных и молекулярно-генетических исследований, включая сбор и подготовку проб биологического материала (крови и сыворотки), проведение анализа длины теломер и уровней маркеров окислительного стресса, а также обработку данных с применением методов статистики. Кроме того, автор провел углубленный анализ научной литературы, охватывающий широкий спектр современных отечественных и зарубежных исследований, с акцентом на воздействие этанола на изменения длины теломер, роль окислительного стресса и их взаимосвязанные механизмы.

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 специальности 3.3.3 «Патологическая физиология» согласно пунктам 1 и 5:

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

2. П.5. Изучение факторов, предрасполагающих к развитию болезни, их влияния 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 содержит 187 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Теломеры, строение и функции

Термин «теломера» (греч. «telos» - конец и «meros» - часть) был предложен учеными Hermann Muller (лауреатом Нобелевской премии по физиологии или медицине 1946 года «за открытие того, что мутации могут быть индуцированы рентгеновскими лучами») и Барбарой МакКлинтон (лауреатом Нобелевской премии по физиологии или медицине 1983 года «за открытие в 1940–1950-е годы мобильных генетических элементов, или «прыгающих генов»»), которые при изучении хромосом дрозофилы и риса показали, что при хромосомных абберациях хромосомы нестабильны и склонны к перестройкам и слиянию, тогда как концы хромосом от этого защищены.

Теломеры представляют собой сложные нуклеопротеиновые структуры, расположенные на концах линейных хромосом эукариот. Они состоят из tandemно повторяющихся коротких последовательностей сателлитной ДНК (у позвоночных – 5'-TTAGGG-3'), не несущих кодирующей информации, но вовлеченных в транскрипцию РНК. Характерной особенностью теломер является наличие одноцепочечного 3'-концевого выступа, обогащенного гуанином (G-цепи), длина которого варьирует от 30 до 400 оснований. Этот выступ способен загибаться и внедряться в двухцепочечную часть теломеры, формируя пространственную структуру, известную как Т-петля, а также сопровождающую ее D-петлю (петлю смещения), которые играют ключевую роль в защите хромосомных концов (Рисунок 1.1) [12].

Теломеры находятся под контролем специализированного белкового комплекса, называемого шелтерин, который играет ключевую роль в поддержании их структуры и стабильности. Этот комплекс регулирует длину теломер и предотвращает активацию клеточных механизмов репарации поврежденной ДНК, скрывая хромосомные концы и подавляя сигнальные

каскады, инициируемые белками ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related) и ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) [42]. У человека этот белковый комплекс состоит из шести субъединиц, включающих TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 и POT1, который связывает теломеры, защищает их от повреждения и регулирует поддержание теломерной ДНК [43].

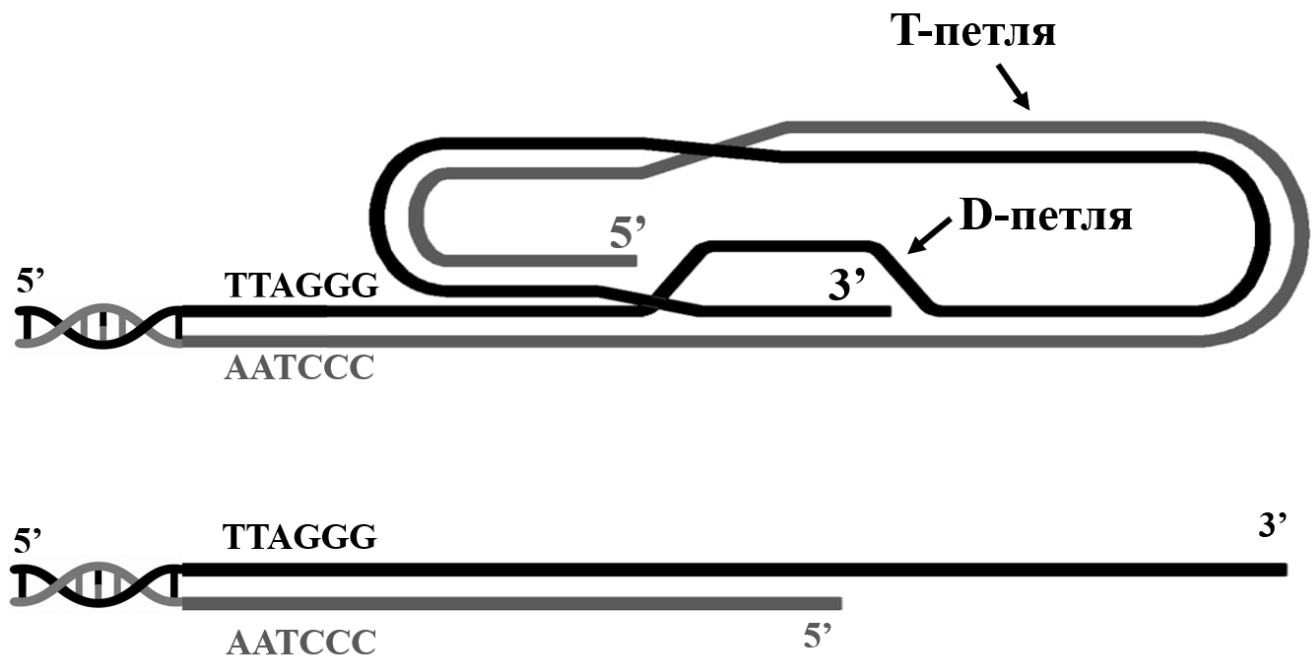


Рисунок 1.1 – Схематическое изображение строения концевых участков хромосом

Теломеры играют ключевую роль в поддержании геномной стабильности и структурной целостности хромосом. Они предотвращают слияние и деградацию хромосомных концов, сохраняя целостность кариотипа. Кроме того, теломерные участки ограничивают пролиферативный потенциал клеток, задавая репликативный предел, известный как предел Хейфлика. Теломеры также участвуют в обеспечении точного расхождения хромосом во время клеточного деления, способствуя правильному распознаванию гомологов и рекомбинационным процессам в мейозе. Помимо этого, они защищают

функционально важные, кодирующие регионы ДНК от утери, обусловленной механизмом концевой недорепликации [44]. Размер теломер при рождении у человека составляет от 8 до 15 т.п.о. [45], и они уменьшаются на 50-200 оснований после каждого цикла репликации (Рисунок 1.2) [46].

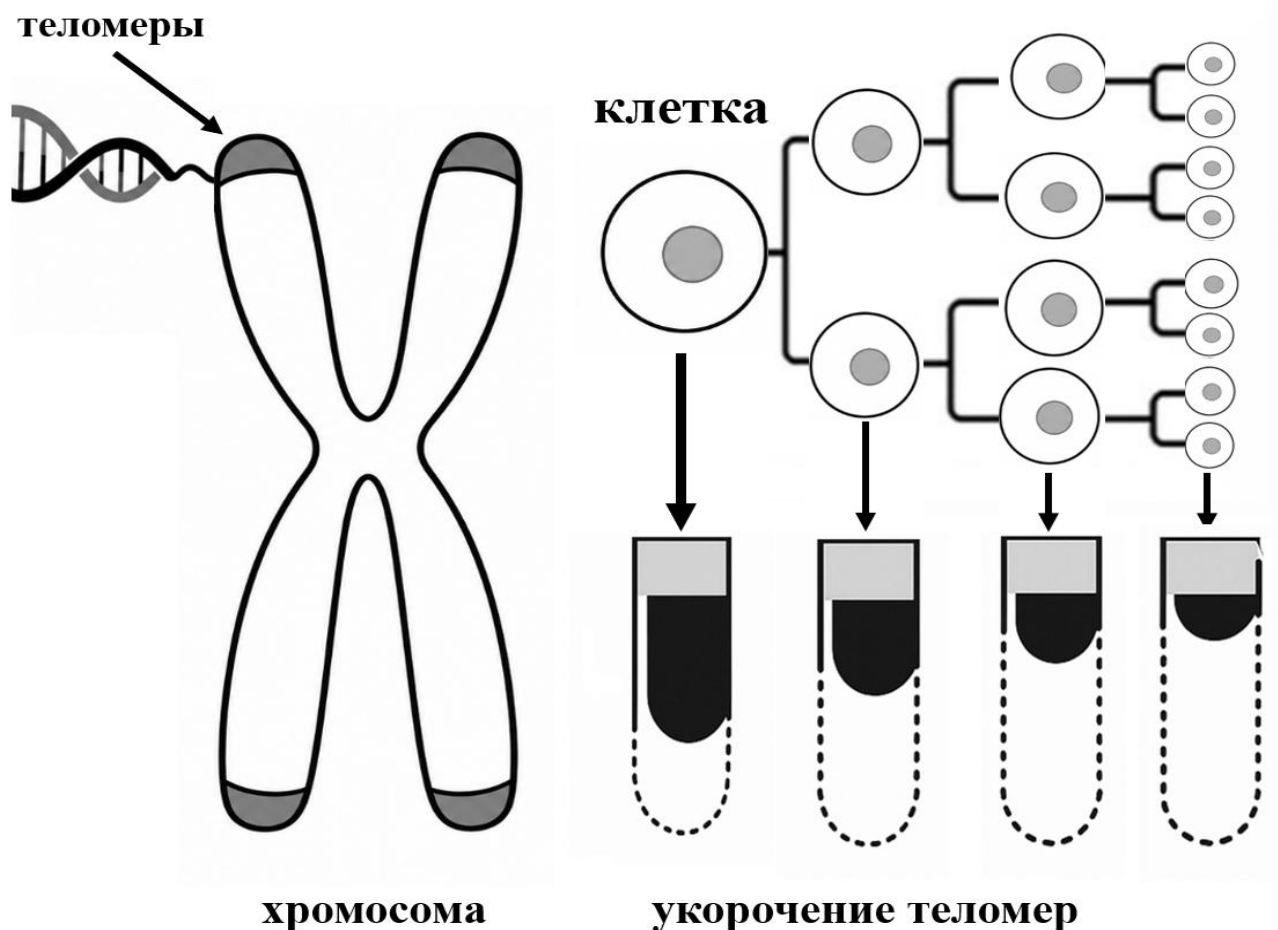


Рисунок 1.2 – Схематичное изображение укорочения концевых участков хромосом во время репликации соматических клеток

1.2 Проблема укорочения теломер и ее биологическое значение

После определенного количества клеточных делений теломеры достигают критической длины [47]. В соответствии с теломерной теорией старения А. М. Оловникова, когда длина теломер значительно снижается, клетки перестают

делиться и начинают стареть, а при достижении критической длины теломер подвергаются апоптозу [48].

У лиц с нарушенной длиной теломер отмечена повышенная предрасположенность к развитию различных патологий, связанных с возрастом, включая нейродегенеративные заболевания [49], сахарный диабет [50], болезни сердечно-сосудистой системы [51], а также злокачественные новообразования [52]. Эти примеры подтверждают актуальность использования длины теломер в качестве клинически значимого показателя [46].

Синдромы коротких теломер (STS) «Short Telomere Syndromes» – это синдромы ускоренного старения, часто вызываемые наследственными мутациями генов, приводящими к уменьшению длины теломер. Следовательно, обычно поражаются системы органов с повышенным клеточным обменом, такие как кожа, костный мозг, легкие и желудочно-кишечный тракт. Менее изучена недавно признанная группа синдромов, связанных с мутациями, ведущими к удлинению теломер, что приводит к предрасположенности к развитию опухолей. Большой объем новых данных в эпидемиологии о длине теломер позволяет пересмотреть представления о роли теломер в старении человека и развитии опухолей, и в некоторых случаях результаты расходятся с тем, что было интерпретировано на модельных системах. Например, короткие теломеры считаются значимыми факторами нестабильности генома, но солидные опухоли, связанные с возрастом, редко встречаются у людей с STS. С другой стороны, длинные теломеры, которые увеличивают продолжительность жизни клеток *in vitro*, в настоящее время считаются наиболее распространенным фактором риска развития рака в популяционных исследованиях [53].

У людей теломеры относительно короткие, их длина от 5 до 15 т.п.о. [45,54], и все же продолжительность жизни людей намного больше, чем у мышей, длина теломер которых может быть около 50 т.п.о. [55,56]. Предыдущие исследования показали, что скорость укорочения теломер, а не их начальная длина, является критической переменной, определяющей продолжительность жизни вида [51,55]. Теломеры человека укорачиваются со скоростью примерно 70

пар оснований в год [54], в то время как теломеры мышей укорачиваются со скоростью 7000 п.о. в год [55]. Подобные различия в скорости укорочения теломер у человека и мыши могут объяснить различия в продолжительности жизни [57].

1.3 Механизмы контроля и изменения длины теломер в клетке

Длина теломер в клетках определяется совокупным влиянием различных факторов, включая активность теломеразы, особенности механизма концевой репликации, воздействие стрессовых условий, в особенности окислительного стресса, а также наличие мутаций в генах, регулирующих длину теломер, что может приводить к их патологическому укорочению или удлинению [58]. Результаты многочисленных исследований демонстрируют, что сокращение длины теломер может значительно ускоряться под влиянием целого ряда внешних и внутренних факторов, таких как инфекционные заболевания [59], психоэмоциональное напряжение [60–62], особенности питания [62,63], уровень физической активности [16], курение [64], употребление алкоголя [18], семейно-социальный статус [65], а также различные медицинские вмешательства [66]. Таким образом, укорочение теломер следует рассматривать как интегральный показатель воздействия множества этиологических факторов. К ключевым механизмам, способствующим разрушению концевых участков хромосом, относятся воспаление, активация иммунного ответа, окислительный и хронический стресс.

1.3.1 Теломераза

Теломераза – один из ключевых ферментов, участвующих в регуляции длины теломер. Этот рибонуклеопroteиновый комплекс обладает обратной транскриптазной активностью и катализирует удлинение G-богатой одноцепочечной теломерной ДНК на ее 3'-конце, используя встроенную РНК-

компоненту в качестве матрицы для синтеза. Вслед за этим С-богатая цепь, соответствующая 5'-концу, достраивается при участии обычного репликативного аппарата. Высокая активность теломеразы наблюдается преимущественно в активно делящихся клетках, таких как стволовые и половые, тогда как в большинстве соматических клеток ее активность минимальна или отсутствует. Это приводит к прогрессивному укорочению теломер при каждом клеточном делении, что усугубляется недостаточной эффективностью репарации поврежденных терминальных участков хромосомной ДНК [58].

Для активации теломеразы *in vitro* достаточно двух основных структурных компонентов: каталитической субъединицы TERT, обладающей активностью обратной транскриптазы, и теломеразной РНК (TR), играющей роль матрицы для синтеза теломерных повторяющихся последовательностей. Однако в живых клетках (*in vivo*) полноценная работа теломеразного комплекса требует участия множества дополнительных белковых факторов, обеспечивающих корректную сборку, локализацию и регуляцию его активности [67].

РНК-компонент теломеразы, обозначаемый как hTR (human telomerase RNA), экспрессируется в большинстве человеческих клеток независимо от уровня теломеразной активности. С 1998 года для гена, кодирующего каталитическую субъединицу фермента, используется наименование hTERT (human telomerase reverse transcriptase). Этот ген включает 16 экзонов и 15 интронов, а его полная длина достигает примерно 37 т.п.о. В нормальных соматических клетках, по всей видимости, hTERT представлен в виде единственной копии. Хромосомная локализация hTERT установлена на коротком плече 5-й хромосомы, в области 5p15.33 [68].

Разногласия, возникшие в 1990-х годах относительно присутствия теломеразной активности в дифференцированных клетках человека и ее колебаний в ходе клеточного цикла, во многом обусловлены постепенным совершенствованием методологических подходов к ее детекции и количественной оценке [69].

Результаты экспериментальных исследований указывают на то, что в клетках, проходящих терминальную дифференцировку, теломеразная активность может ингибироваться посредством нескольких независимых механизмов. К ним относят снижение транскрипции гена hTERT [70], возникновение альтернативных вариантов сплайсинга [71], нарушение сборки или снижение стабильности ферментного комплекса, а также посттрансляционные модификации, способные влиять на каталитическую активность теломеразы или ее способность взаимодействовать с теломерами [72]. Следовательно, сохранение активности теломеразы играет ключевую роль в поддержании стабильной длины теломер.

1.3.2 Теломерная РНК

Долгое время считалось, что теломеры не подвергаются транскрипции. Однако исследования показали, что у млекопитающих РНК-полимераза II способна транскрибировать теломерные повторы, синтезируя теломер-ассоциированную некодирующую РНК (TERRA). У человека этот процесс может происходить на всех теломерах, тогда как у мышей он ограничен всего двумя хромосомами, что свидетельствует о межвидовых различиях в механизмах регуляции транскрипции теломерных регионов [73].

Молекулы TERRA имеют разную длину, их синтез начинается в субтеломерных участках и направлен к концам хромосом. Они содержат стартовую субтеломерную последовательность и теломерные повторы UUAGGG, но не охватывают всю теломерную область, поэтому их длина обычно не превышает 400 оснований.

TERRA локализуется на теломерах, а ее стабильность регулируется белками семейства SMG, которые подавляют ее ассоциацию с хроматином и защищают теломеры [73]. Экспрессия TERRA контролируется эпигенетически: метилирование промоторов DNMT3b/DNMT1 и модификации гистонов (H3K9-метилирование, HP1 α) подавляют ее синтез. TERRA регулирует длину теломер, взаимодействуя с теломеразой. Ее UUAGGG-повторы комплементарны TERC и

могут подавлять активность фермента, но связывающие ее белки (например, hnRNPA1) ослабляют этот эффект [74].

Кроме того, TERRA образует R-петли с C-богатой теломерной цепью, что способствует рекомбинации и альтернативному удлинению теломер (ALT-механизму), замедляя клеточное старение. Таким образом, TERRA играет двойственную роль: она может как ингибировать теломеразу, так и способствовать удлинению теломер через различные механизмы.

1.3.3 Эпигенетическое влияние

Эпигенетическая регуляция длины теломер включает метилирование ДНК, модификации гистонов и связывающие белки, контролирующие доступность теломерных последовательностей. Метилирование CpG-островков в субтеломерных областях DNMT1 и DNMT3b снижает экспрессию некодирующей РНК TERRA, подавляя альтернативные пути удлинения теломер [75].

Гистоновые модификации, такие как H3K9me3 и H4K20me3, способствуют образованию гетерохроматина, стабилизируя теломеры, в то время как ацетилирование H3K9ac и H4K16ac ослабляет их упаковку, повышая транскрипционную активность [76,77]. Белок HP1α связывается с H3K9me3, подавляя экспрессию TERRA и предотвращая деградацию хромосомных концов [78].

У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* уровень транскрипции TERRA обратно пропорционален длине теломер, что способствует направленной доставке теломеразы к укороченным концам [79]. Таким образом, эпигенетические механизмы балансируют между стабильностью теломер и их динамическими изменениями, влияя на процессы старения и канцерогенеза.

1.4 Различия в длине теломер разных типов клеток, включая лейкоциты

Данные о корреляции длины теломер, измеренной в разных тканях одного и того же человека, весьма ограничены. Некоторые исследования, в основном у пожилых людей, предполагают возможную вариабельность длины теломер в разных тканях [80]. Исследования длины теломер при онкологических и других заболеваниях оценивали только аномальную ткань [81]. Средняя длина теломер цельной крови отражает длину теломер в большинстве тканей. Длина теломер обратно пропорциональна возрасту в большинстве тканей, и эта связь наиболее сильна для тканей с наиболее короткими теломерами [82].

У эмбрионов и у новорожденных детей длина теломер одинакова в разных тканях, тогда как у взрослых она в разных тканях имеет более выраженные различия [83]. Эти различия, вероятно, являются результатом пути репликации, специфичного для каждого типа клеток, и определяются регуляторными путями и микроокружением, в котором находятся клетки. Лин и др. [84] установили, что, несмотря на наличие корреляции в длине теломер между мононуклеарными клетками периферической крови, Т-лимфоцитами, В-лимфоцитами и моноцитами, скорость укорочения теломер для этих клеточных популяций не коррелирует. Показано, что активность теломеразы, изменения в составе лимфоцитарной популяции и физиологические параметры, такие как гипергликемия и уровень интерлейкина-6 (IL-6), объясняют значительную долю возрастного укорочения теломер, которое составляет около 30 % от общей вариабельности данного процесса. Еще один фактор, влияющий на длину теломер во многих типах тканей, – это генетическая изменчивость. При этом длина теломер может опосредовать влияние возраста на экспрессию генов [82].

Если говорить о типе материала, который является универсальным индикатором длины теломер в тканях организма, то определение ее в цельной крови может служить показателем длины теломер в большинстве других тканей. Установлено, что длина теломер в зрелых соматических тканях, таких как лейкоциты, эпидермис, скелетная мускулатура и подкожно-жировая клетчатка,

демонстрирует выраженную корреляцию, а темпы укорочения теломер в этих тканях сопоставимы [85]. Полученные данные указывают на то, что длина теломер в периферических лейкоцитах может достоверно отражать длину теломер в других дифференцированных клетках организма, выступая надежным прокси-показателем. Тем не менее широкое клиническое применение данного параметра в качестве рутинного биомаркера на текущем этапе ограничено из-за существующих преаналитических и аналитических трудностей, таких как вариабельность методов измерения, стандартизация пробоподготовки и интерпретация результатов [16].

1.4.1 Проблемы репарации и концевая недорепликация

Впервые проблема репликации концов линейных хромосом эукариот была сформулирована и подробно описана в виде теории маргинотомии А. М. Оловниковым на русском языке в 1971 г. [48]. Она возникает только при репликации 3'-конца.

Явление концевой репликации связано с тем, что репликативный аппарат неспособен полностью воспроизводить последовательность на 5'-концах линейных молекул ДНК во время S-фазы клеточного цикла. Эта ограниченность обусловлена направленностью синтеза нуклеиновых кислот (только в направлении $5' \rightarrow 3'$) и особенностями механизма репликации. В то время как ведущая цепь синтезируется непрерывно и полностью, на отстающей цепи остается участок, который не может быть скопирован после удаления праймера РНК. В результате при каждом цикле деления одна из теломер оказывается укороченной, и после митоза укороченные участки распределяются между дочерними клетками. Таким образом, теломеры постепенно теряют часть своей последовательности при каждом клеточном делении, сокращаясь на десятки оснований [86].

Помимо проблемы репликации концов хромосом, значительную роль в укорочении теломер может играть проблема восстановления теломер. Этот процесс можно разделить на две взаимосвязанные составляющие: проблему

восстановления концов ДНК и проблему восстановления теломер, опосредованного шелтеринном. Неполная репарация концов ДНК заключается в неспособности системы репарации завершить репарацию повреждения, если оно произошло на крайних концах теломер, поскольку репарационные белки не могут корректно работать на грани матрицы.

В отличие от внутренних двуцепочечных разрывов ДНК, которые могут быть устранены посредством гомологичной рекомбинации или нехомологичного соединения концов, повреждения на теломерных участках часто остаются нерепарированными. Это связано с особенностями структуры теломер и наличием комплекса шелтерина, который маскирует концы хромосом и предотвращает активацию стандартных путей репарации [87]. Теломерные участки ДНК в комплексе с ассоциированными белками образуют специфическую пространственную структуру – Т-петлю, которая служит важным элементом защиты хромосомных концов. Эта структура маскирует теломеры от систем клеточного ответа на повреждения ДНК, препятствуя доступу белков, вовлеченных в распознавание и репарацию двуцепочечных разрывов. Формирование Т-петли эффективно предотвращает активацию механизмов, способных ошибочно интерпретировать естественные концы хромосом как поврежденную ДНК. Особенно уязвимым является состояние теломеры до образования Т-петли, когда ее концы остаются открытыми и менее защищенными от репарационных воздействий [88].

В результате при повреждении теломерных концов восстановление может либо не инициироваться вовсе, либо оставаться незавершенным, что ведет к потере теломерных последовательностей и дальнейшему укорочению хромосомных концов. Разрывы, возникающие на крайних участках хромосом, могут приводить к полному отделению терминального фрагмента ДНК, при котором белки репарации не способны даже частично восстановить структуру. Дополнительно активность нуклеаз, поддерживающих конфигурацию теломер, может усугублять потерю оснований. Такие повреждения сопровождаются

устойчивой активацией ответа на повреждение ДНК и длительной остановкой клеточного цикла.

Укорочение теломер в этом случае происходит не только на самих концах хромосом, но и в пределах всей теломерной последовательности, что усиливает эффект кумулятивной потери теломерного материала [58].

1.4.2 Окислительный стресс как важный фактор укорочения длины теломер

Окислительный стресс оказывает разрушающее действие на чувствительные к окислительному повреждению теломерные повторы 5'-TTAGGG-3', что сопровождается образованием 8-oxodG и двуцепочечными разрывами ДНК, индуцируемыми активными формами кислорода (АФК). Кроме прямого повреждения ДНК, окислительный стресс способен нарушать функцию митохондрий, что приводит к усиленной генерации АФК, что в свою очередь усиливает повреждение ДНК и ускоряет укорочение теломер [89].

Особенно уязвимыми являются терминальные участки ДНК, повреждение которых нарушает эффективность репарации [58]. В то же время остается нерешенным вопрос: является ли сокращение теломер отражением митотического счетчика или же выступает преимущественно как маркер стрессового воздействия [24]. В этой связи полноценная интерпретация изменений длины теломер требует обязательной оценки уровня окислительного стресса.

1.5 Алкоголь и механизмы регуляции длины теломер

Этанол обладает уникальными физико-химическими характеристиками, включая низкую молекулярную массу и амфипатические свойства, что обеспечивает его высокую проникающую способность через клеточные мембраны. Способность растворяться как в воде, так и в липидах способствует эффективной диффузии через фосфолипидный бислой, приводя к нарушению его структурной целостности и изменению биофизических свойств [90]. Внутри

клетки этанол взаимодействует с белками, липидами и нуклеиновыми кислотами, изменяя их структуру и функцию. Повреждение мембран, дисфункция митохондрий и инактивация ферментов сопровождаются нарушением клеточного метаболизма, что играет ключевую роль в патогенезе заболеваний, связанных с употреблением этанола [91].

Метаболизм этанола преимущественно осуществляется в гепатоцитах посредством ферментативного окисления. На первом этапе под действием алкогольдегидрогеназы этанол окисляется до ацетальдегида, высокореактивного и токсичного соединения. Этот процесс сопровождается увеличением соотношения NADH/NAD^+ , что нарушает редокс-гомеостаз клетки и способствует образованию активных форм кислорода [92]. АФК индуцируют окислительный стресс, приводящий к повреждению ДНК, белков и липидов. Ацетальдегид может образовывать ковалентные аддукты с белками и нуклеиновыми кислотами, активируя воспалительные каскады. Хроническое воздействие этанола приводит к истощению глутатиона и других антиоксидантов, усугубляя клеточное повреждение [92]. Окислительный стресс и токсичность ацетальдегида особенно значимы для теломер, поскольку механизмы репарации в этих регионах менее эффективны, а теломерная ДНК особенно чувствительна к действию АФК [93]. Повреждение теломер приводит к их ускоренному укорочению, хромосомной нестабильности, снижению пролиферативного потенциала и активации апоптоза [31].

1.5.1 Алкоголь и окислительный стресс

Хроническое злоупотребление алкоголем (более 30 г/сутки) ассоциировано с патологическими изменениями многих органов и систем организма, в основе которых лежат различные механизмы, включая развитие окислительного стресса. При этом окислительный стресс вовлечен в этиологию нервно-психических заболеваний, вызывая ускоренное укорочение теломер, митохондриальную дисфункцию, эксайтотоксичность и изменения нейромедиаторных систем [94]. Данные, полученные в экспериментах на клеточных культурах, животных

моделях и в клинических исследованиях, свидетельствуют о связи между окислительным повреждением ДНК и выраженностью синдрома отмены алкоголя, включая развитие алкогольного делирия. При хроническом злоупотреблении алкоголем также отмечается укорочение теломера, что, вероятно, отражает накопление клеточного стресса и повреждений на молекулярном уровне [19].

На разных стадиях развития алкогольной зависимости в периоде абстиненции, в постабстинентной фазе и при формировании ремиссии наблюдается усиление процессов окислительного стресса. Это связано с повышенной продукцией активных форм кислорода и снижением эффективности антиоксидантной защиты, что приводит к нарушению редокс-гомеостаза и накоплению молекулярных повреждений в клетках [3]. Окислительный стресс оказывает многоплановое воздействие на организм, нарушая нормальное функционирование большинства органов и систем. Он существенно влияет на выраженность симптоматики, формируя особенности клинического течения заболевания, и способствует возникновению соматических осложнений, тем самым отягощая общий патологический процесс [95]. О значительной роли свободнорадикальных механизмов в развитии алкогольной болезни печени свидетельствует выявление продуктов перекисного окисления липидов в тканях печени и сыворотке крови пациентов. Эти данные подтверждаются экспериментальными исследованиями на грызунах, где установлена прямая связь между алкоголь-индуцированным окислительным стрессом и формированием патологических изменений в печени [96].

Метаболизм этанола сопровождается усиленным образованием и накоплением активных форм кислорода (АФК) [28]. При хроническом употреблении алкоголя уровень АФК в клетках существенно возрастает, что приводит к нарушению редокс-гомеостаза и функциональному расстройству антиоксидантной системы. В частности, изменяется активность ключевых ферментов, регулирующих метаболизм глутатиона, включая процессы его синтеза и деградации [97]. Дополнительным источником окислительного стресса при

алкогольной зависимости является спонтанная генерация активных форм кислорода лейкоцитами, что усиливает системное прооксидантное воздействие и способствует развитию молекулярных повреждений [28].

В период абстиненции у пациентов фиксируется значительное снижение уровня глутатиона в плазме крови, а также нарушения в активности ключевых антиоксидантных ферментов – каталазы и супероксиддисмутазы. Эти изменения сопровождаются повышением концентрации активных форм кислорода, что свидетельствует об усилении окислительного стресса и снижении эффективности антиоксидантной защиты организма [28,29]. В постабстинентном периоде у пациентов наблюдаются изменения активности каталазы в сыворотке крови по сравнению с уровнями, характерными для здоровых индивидов, что указывает на продолжающееся нарушение антиоксидантной системы даже после завершения острого абстинентного состояния [29].

Связь между потреблением алкоголя, усилением окислительного стресса и укорочением теломер подтверждена рядом исследований. Однако в научной литературе сохраняется существенная разнородность результатов, касающихся влияния алкоголя на длину теломер, что может быть обусловлено различиями в дизайне исследований, дозировках потребления, характеристиках выборок и используемых методах оценки длины теломер [18].

В то время как развитие окислительного стресса при хроническом злоупотреблении алкоголем является общепризнанным фактом, влияние умеренного потребления остается предметом дискуссии. Результаты исследований на животных и людях позволяют предположить, что острое, кратковременное воздействие этанола, как правило, не приводит к выраженным изменениям показателей окислительного стресса и не оказывает критического воздействия на антиоксидантную систему организма [92].

Изучение пороговых уровней и длительности потребления алкоголя, достаточных для индукции окислительного стресса, представляет значительные методологические и этические трудности. Проведение контролируемых клинических исследований с длительным введением этанола здоровым

добровольцам является недопустимым с этической точки зрения, что ограничивает их количество и глубину. В связи с этим основная часть данных получена в рамках ретроспективных или поперечных исследований, где уровень потребления алкоголя часто оценивается с помощью анкетирования, характеризующегося ограниченной точностью и субъективностью.

Использование грызунов в качестве модельных организмов при изучении хронической алкогольной интоксикации также имеет ограничения, связанные с существенными межвидовыми различиями и короткой продолжительностью жизни этих животных. В этом контексте моделирование хронического потребления алкоголя на приматах, обладающих высокой степенью биологического и поведенческого сходства с человеком, представляет собой более адекватный и ценный инструмент для экстраполяции результатов на человека [98].

Использование обезьян в исследованиях хронической алкогольной интоксикации позволяет учитывать широкий спектр нейроэндокринных, психоэмоциональных и социально-поведенческих факторов, отражающих сложную природу алкогольной зависимости. Такие аспекты, как стресс, тревожность и негативные эмоциональные состояния, оказывают существенное влияние на инициацию, поддержание и рецидив употребления алкоголя, и их воспроизведение на приматах обеспечивает более полное моделирование человеческих паттернов аддиктивного поведения [99].

Таким образом, вопрос индукции окислительного стресса в условиях хронического потребления алкоголя остается недостаточно изученным и требует дальнейших исследований с учетом межвидовых различий, индивидуальной чувствительности и сложности взаимодействия метаболических и нейropsychологических факторов.

1.5.2 Исследования алкоголя и длины теломер на клеточном уровне и в экспериментах *in vivo*

Несмотря на значительный массив исследований в культурах клеток с воздействием этанола, число работ, в которых непосредственно определяли длину теломер, экспрессию TERT или активность теломеразы, невелико.

Нарушение регуляции теломеразы рассматривается как один из возможных механизмов, связывающих повреждение гепатоцитов с прогрессированием хронических заболеваний печени и развитием гепатоцеллюлярной карциномы [100]. В двух исследованиях на культуре гепатоцитов человека LO2 воздействие этанола в концентрации 100 мМ в течение 24 ч сопровождалось формированием признаков клеточного старения, повышением уровня γ -H2AX и снижением экспрессии TERT либо активности теломеразы. Модуляция сигнальных путей miR-194/FXR и YAP частично ослабляла эти изменения, что свидетельствует об участии данных механизмов в клеточном ответе гепатоцитов на этанольное воздействие [32,34]. В культуре нейросфер, полученных из коры головного мозга эмбрионов крыс, четырехсуточное воздействие этанола в концентрациях 120 и 620 мг/дл усиливало пролиферацию клеток. При низкой концентрации уровень мРНК TERT умеренно повышался, а при высокой – снижался, тогда как активность теломеразы в обеих группах не отличалась от контроля. Длина теломер в данной работе не измерялась, поэтому полученные результаты характеризуют изменение регуляции теломеразного комплекса, но не доказывают укорочение теломер [33].

Непосредственное влияние этанола на длину теломер изучено лишь в единичных работах. Воздействие 25 мМ этанола в течение одной недели на первичные и иммортализованные фибробласты крайней плоти человека, а также клетки НерG2 сопровождалось умеренным укорочением теломер; сходный эффект наблюдался при воздействии 25 мкМ ацетальдегида. Концентрация 25 мМ соответствует приблизительно 1,15 г этанола на литр среды; при условном равномерном распределении в 60 л это составляет около 69 г этанола – примерно 220 мл 40 % напитка. Такой расчет является только приблизительным

сопоставлением и не отражает фактически выпитую дозу, поскольку не учитывает объем распределения, всасывание и элиминацию этанола. В длительном эксперименте на иммортализованных фибробластах исследовали также концентрации 1 и 10 мМ, и укорочение теломер отмечалось уже после первой недели и становилось статистически значимым после четырех недель, причем уменьшение составляло 22 % при 1 мМ и 16 % при 25 мМ, что свидетельствует о нелинейной зависимости эффекта от концентрации. Активность теломеразы при воздействии 1–25 мМ этанола не изменялась, однако возрастало связывание TRF2 с теломерами и изменялось метилирование субтеломерных участков, что указывает на возможное участие теломеразы-независимых механизмов [31].

В эмбриональных стволовых клетках человека, подвергнутых воздействию 0, 25, 50 или 100 мМ этанола в течение 3, 7 и 14 суток, изменение длины теломер зависело прежде всего от продолжительности экспозиции, а не от концентрации. После семи суток длина теломер и экспрессия большинства исследованных компонентов комплекса шелтерина снижались по сравнению с трехсуточной экспозицией; к четырнадцатым суткам экспрессия восстанавливалась, а дальнейшего укорочения теломер не происходило, что авторы связывали с адаптацией клеток к воздействию этанола [35].

В эксперименте на пекарских дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae*) длительное воздействие тринадцати факторов среды вызывало разнонаправленные изменения длины теломер. Этанол, другие спирты и уксусная кислота приводили к удлинению теломер и увеличению вариабельности их длины, причем эффект этанола сохранялся у клеток, не способных использовать его как источник углерода. Эти данные демонстрируют, что стресс, вызванный этанолом, не обязательно сопровождается укорочением теломер, однако особенности теломерной биологии дрожжей ограничивают прямой перенос результата на позвоночных [36].

На *Danio rerio* связь этанола с длиной теломер изучали с учетом индивидуального предпочтения алкоголя. У рыб с фенотипами Heavy, Inflexible и Negative Reinforcement, проявлявших предпочтение этанола, относительная длина

теломер в головном мозге была меньше, чем у группы Light, не демонстрировавшей такого предпочтения. У этих же животных отмечали повышение активности антиоксидантных ферментов, а длина теломер отрицательно коррелировала с активностью супероксиддисмутазы и каталазы. Поскольку группы формировали по поведенческому фенотипу после острой экспозиции, результаты указывают на ассоциацию теломерных изменений с предпочтением и фактическим потреблением этанола, но не позволяют отделить следствие воздействия от исходной предрасположенности [37].

В длительном эксперименте на самках мышей CD1 сравнивали воду, воду с добавлением 3,5 мл этанола на 1 л и воду с добавлением 25 мл красного вина крепостью 14 % на 1 л при стандартном и высокожировом рационе. При стандартном рационе значимых различий длины теломер в ооцитах, сердце и ткани хвоста между группами не выявлено. При высокожировом рационе длительное умеренное потребление чистого этанола сопровождалось укорочением теломер, тогда как в группе красного вина показатели не отличались от контроля с водой. Таким образом, эффект этанола проявился только при сочетании с дополнительной метаболической нагрузкой и зависел от состава напитка [38].

В совокупности экспериментальные данные не подтверждают универсального однонаправленного влияния этанола на теломеры: в дрожжах наблюдали удлинение, в ряде культур клеток млекопитающих – укорочение теломер или подавление элементов теломеразного комплекса, а у позвоночных животных результат зависел от поведенческого фенотипа и рациона. На характер ответа могут влиять вид модельного объекта, тип ткани и клеток, концентрация и длительность экспозиции, способность метаболизировать этанол и сопутствующая метаболическая нагрузка. Контролируемые эксперименты подтверждают возможность прямого воздействия этанола на теломерный аппарат, но не позволяют сформулировать единый дозозависимый эффект для целостного организма млекопитающего. Ограниченность длительных исследований *in vivo*,

особенно на приматах, определяет необходимость дальнейшего изучения этой связи на моделях, наиболее близких человеку.

1.6 Влияние потребления алкоголя на длину теломер в клинических исследованиях

Мы провели систематический обзор исследований, посвященных влиянию потребления алкоголя на длину теломер у человека [19]. Поиск литературы осуществлялся в базах данных PubMed и eLIBRARY.RU с использованием поисковых комбинаций терминов («Этанол» ИЛИ «Алкоголь») И «Теломера», с ограничением по дате публикации до 1 января 2011 года. В результате были идентифицированы 269 публикаций. Из них 238 исключены по критериям отбора, еще 3 – из-за отсутствия доступа к полным текстам. В окончательный анализ включены 28 эпидемиологических и клинических исследований.

Связь между потреблением алкоголя и укорочением теломер была выявлена в 16 из 28 работ. Эти исследования охватывали различные популяции и когорты, включая лиц с алкогольной зависимостью, хроническим злоупотреблением алкоголем, а также носителей определенных генетических вариантов, влияющих на метаболизм этанола. В оставшихся 12 исследованиях статистически значимой ассоциации между употреблением алкоголя и длиной теломер выявлено не было.

Анализ включенных публикаций показал высокую гетерогенность как в характеристиках исследуемых групп, так и в методах оценки. В одних работах сравнивалась длина теломер у пациентов с алкоголь-ассоциированными расстройствами и в контрольных группах, в других изучалось влияние потребления алкоголя на длину теломер в общей популяции или в специфических когортах – например, у представителей определенных профессий (медицинский персонал, преподаватели) или расовых/этнических групп (Таблицы 1.1 и 1.2). Такая разнородность дизайна исследований, характеристик выборок, уровней

потребления алкоголя и применяемых методик измерения длины теломер создает определенные трудности для интерпретации результатов. Эти различия, вероятно, лежат в основе наблюдаемой вариабельности эффектов этанола на длину теломер в лейкоцитах периферической крови. Сводный анализ данных, полученных в рамках включенных исследований, представлен ниже (Таблица 1.1).

Крупнейшее на сегодняшний день поперечное эпидемиологическое исследование было проведено на выборке из 422 407 участников обоего пола в Великобритании [101]. Одним из наиболее значимых факторов, ассоциированных с уменьшенной длиной теломер, оказалось наличие эпизодов потребления алкоголя до включения в исследование [101]. Среди работ, продемонстрировавших связь между употреблением алкоголя и укорочением теломер, в семи исследованиях установлено, что именно злоупотребление алкоголем является достоверным фактором, способствующим сокращению длины теломер. Эти данные подчеркивают роль хронического воздействия этанола как одного из значимых модифицируемых факторов, влияющих на клеточное старение [102–108]. Установлено, что относительная длина теломер лейкоцитов периферической крови у лиц с хроническим злоупотреблением алкоголем значительно снижена, при этом данный эффект наблюдается независимо от статуса курения. Количество эпизодов употребления алкоголя в течение года коррелировало с длиной теломер как в общей выборке, так и в подгруппе злоупотребляющих.

Дополнительно выявлена ассоциация генетических вариантов ферментов метаболизма этанола с особенностями его потребления и длиной теломер. Носители вариантов, связанных с более высокой активностью алкогольдегидрогеназы, употребляли алкоголь реже и имели большую длину теломер по сравнению с носителями менее активных вариантов фермента [102]. Сходные результаты получены и в другом исследовании, где у носителей менее активного варианта алкогольдегидрогеназы выявляли более короткие теломеры в клетках слизистой оболочки полости рта [109]. Однако несмотря на выраженные различия в длине теломер, уровни потребления алкоголя между генетическими

подгруппами существенно не различались, что, вероятно, связано с ограниченным размером выборки [109].

В отдельной работе [103] установлена связь между высоким среднесуточным потреблением этанола (>30 г/сутки) и укорочением средней длины теломер у носителей определенных вариантов гена альдегиддегидрогеназы 2. Эти данные указывают на важную роль генетических особенностей метаболизма этанола в уязвимости к теломерной дисфункции, особенно при высоком уровне его потребления [103].

В рамках одного из проспективных когортных исследований, проведенного среди представителей бизнес-среды Финляндии [110], оценивалась связь между уровнем потребления алкоголя в среднем возрасте (на 1974 год) и длиной теломер в пожилом возрасте (оценки проводились в 2002–2003 годах). Было установлено, что высокое потребление этанола в более раннем возрасте ассоциировано с укорочением теломер и увеличением доли коротких теломер спустя несколько десятилетий.

Среди факторов, ограничивающих интерпретацию результатов, следует отметить отсутствие данных о длине теломер на момент включения в исследование, анализ только среди мужчин, доживших до позднего возраста, а также относительную однородность выборки по социально-экономическому статусу. Тем не менее, учитывая стабильный уровень потребления алкоголя в пределах подгрупп, авторы рассматривают полученные результаты как достоверные и обоснованные [110].

В еще одном исследовании алкогольной зависимости [104] анализировали данные 48 пациентов со злокачественными новообразованиями верхних отделов аэродигестивного тракта на фоне злоупотребления алкоголем, 86 сопоставимых с ними по возрасту лиц без онкологических заболеваний и 121 участника контрольной группы без признаков алкоголь-ассоциированных нарушений. В целом было зафиксировано укорочение теломер у лиц с алкогольной зависимостью, при этом наличие онкологической патологии не оказывало значимого влияния на длину теломер [104]. Сходные результаты получены в

исследовании [105], где сравнивались 260 пациентов с подтвержденными неблагоприятными последствиями хронического потребления алкоголя и 449 здоровых лиц. В данной работе выявлена связь между фактом злоупотребления алкоголем и укороченной длиной теломер, однако зависимость от суммарной дозы потребления или длительности интоксикации установлена не была [105].

Не все исследования подтверждают наличие связи между потреблением алкоголя и длиной теломер. В частности, анализ данных более чем 2000 участников из двух независимых проспективных когорт (Heart and Soul Study и Cardiovascular Health Study [18]) с пятилетним периодом наблюдения не выявил ни одной статистически значимой модели, в которой бы уровень потребления алкоголя коррелировал с динамикой длины теломер.

Лишь в одном из этих исследований потребление высоких разовых доз алкоголя (binge drinking) оказалось связано с более короткими теломерами. При этом участники обоих проектов страдали от различных сердечно-сосудистых заболеваний, сахарного диабета, а также отличались по уровню табакокурения, но указанные сопутствующие факторы не оказывали значимого влияния на связь между употреблением алкоголя и длиной теломер.

С учетом известной отрицательной корреляции между умеренным потреблением алкоголя и рисками сердечно-сосудистой патологии и смертности, была предпринята попытка смоделировать гипотетическое влияние «оптимального» уровня потребления на увеличение длины теломер. Однако оно не было подтверждено [18].

В рамках исследования Copenhagen City Heart Study, охватившего более 4000 мужчин и женщин, не было выявлено статистически значимой ассоциации между уровнем потребления алкоголя и длиной теломер ни на исходном этапе, ни при повторной оценке через десять лет наблюдения [17]. Сходные результаты получены и в другой проспективной работе, включавшей 1860 участников: по итогам шестилетнего наблюдения влияния алкоголя на динамику длины теломер также не было установлено [111].

В ряде исследований обнаружено не только укорочение, но и увеличение длины теломер на фоне потребления алкоголя. Так, в уже упомянутом Copenhagen City Heart Study [17] при повторной оценке длины теломер среди более 4000 мужчин и женщин спустя 10 лет у 56 % участников наблюдалось их укорочение, тогда как у 44 % отмечалось увеличение длины теломер. При этом изменение длины теломер за десятилетний период оказалось обратно пропорционально как исходной длине теломер, так и возрасту обследованных.

Аналогичные данные представлены в другом исследовании [111], где в течение 6 лет наблюдения у 510 человек (27 %) зафиксировано укорочение теломер более чем на 5 %, у 479 участников (26 %) – увеличение длины теломер более чем на 5 %, а у 871 респондента (47 %) длина теломер оставалась в пределах относительной стабильности (± 5 %). Эти результаты подчеркивают высокую межиндивидуальную вариабельность изменений длины теломер, в том числе в контексте потребления алкоголя [111].

Анализ представленных исследований также указывает на возможные популяционные различия в характере связи между потреблением алкоголя и длиной теломер. В частности, легкое или умеренное потребление алкоголя на еженедельной или ежемесячной основе ассоциируется с большей длиной теломер у представителей белой расы. Напротив, регулярное, в том числе еженедельное или ежедневное, употребление алкоголя среди лиц с африканским и латиноамериканским происхождением сопряжено с более короткими теломерами. Особенно выраженная отрицательная связь между ежедневным потреблением алкоголя и длиной теломер наблюдается у темнокожих и латиноамериканских женщин, что может отражать как генетические особенности, так и различия в действии социально-биологических и поведенческих факторов [112].

Тем не менее данные двух других исследований [106,107] не подтверждают наличие популяционных различий в связи между потреблением алкоголя и длиной теломер. Таким образом, более высокий уровень алкогольной экспозиции не во всех исследованиях сопровождался ожидаемым уменьшением длины

теломер и не позволял однозначно объяснить межгрупповые различия данным фактором.

Расхождения между результатами отдельных работ могут быть связаны с различиями в характеристиках обследованных популяций, распределении участников по полу и возрасту, структуре потребления алкоголя и способах оценки его уровня. Существенное значение может иметь и влияние сопутствующих факторов, способных независимо изменять длину теломер и модифицировать выявляемые ассоциации. В совокупности это подчеркивает противоречивость существующих данных и указывает на необходимость дальнейших исследований с учетом генетических, поведенческих и социальных факторов, а также их возможного взаимодействия [19].

Таблица 1.1 – Ассоциация потребления алкоголя с длиной теломер в лейкоцитах: данные эпидемиологических и клинических исследований

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
О: лица, злоупотребляющие алкоголем (DSM-IV); К: 11 трезвенников и лица, периодически употребляющие алкоголь (Италия)	О: 35–75 (средний – 38); 200 (М) К: 25–62 (средний – 44); 257 (М)	Нет данных по длительности потребления. О: 45 % – более 2 доз в день; К: 29 % – более 2 доз в день	qPCR	Уменьшена относительная средняя длина в опытной группе; [102] 2011
LIFE; лица с гипертензией и гипертрофией левого желудочка (Дания, Финляндия, Исландия, Норвегия, Швеция, Великобритания и США)	55–80; 668 (М) и 603 (Ж)	Не указан	TRF	Отсутствие ассоциации потребления алкоголя с длиной теломер (данные не приведены); [113] 2011

Продолжение таблицы 1.1

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
Dallas Heart Study (DHS); различные нации (США)	18–85 (медиана – 50); 3302 обоего пола из разных этнических групп	0–5,6 г/сут	TRF	Отсутствие ассоциации потребления алкоголя с длиной теломер (данные не приведены); [114] 2012
The Helsinki Businessmen Study; 98,4 % здоровые, не принимающие лекарств (Финляндия)	В начале исследования в 1974 году – 46,7±3,9; при определении длины теломер в 2002–2003 гг. – 75,7±3,9; 499 (М)	5 групп с уровнями потребления: 0,14 г/сут; 14–28 г/сут; 28–70 г/сут; > 70 г/сут. Медиана потребления в 1974 году – 126 г/нед (интерквартильный диапазон – 56–238), в 2002–2003 гг. – 98 г/нед (интерквартильный диапазон – 28–168)	TRF	Значимая обратная связь между потреблением алкоголя в среднем возрасте и длиной теломер в пожилом возрасте; [110] 2012
Nurses' Health Study (США)	58,7±0,09; 5862 (Ж)	На основе опросников 0,4±0,04 доз в день	qPCR	Отсутствие ассоциации между уровнем потребления алкоголя и длиной теломер; [115,116]
	Медиана – 59,8; 1715 (Ж)	На основе опросников в среднем от 6,2±9,0 до 7,2±9,6 г/сут		
The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), США	48,58±17,91; 5360 (М) и (Ж)	На основе опросников: абстиненты – 38 %, умеренный уровень – 59 %, высокий уровень потребления – 3 %	qPCR	Употребление алкоголя статистически значимо не связано с длиной теломер; [117] 2013
MONICA 1 и MONICA 10 (Дания)	MONICA 1: 44,7±10,9; 915 (М) и 847 (Ж); MONICA 10: 55,0±10,7; 1104 (М) и 1110 (Ж)	На основании опросника: число доз алкоголя в неделю – 9,5±12,1 и 10,0±12,3 в исследованиях MONICA 1 и MONICA 10 соответственно	qPCR	Потребление алкоголя связано с длиной теломер, но вариабельность данных не позволяет сделать точных выводов; [118] 2014

Продолжение таблицы 1.1

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
Афроамериканцы (условно-здоровые и лица с идиопатической дилатационной кардиомиопатией)	К: 39,9±15,4; 227 (49,3% Ж); О: 51,1±11,3; 223 (37 % Ж)	Регулярно употребляли алкоголь 35,7 % К и 14,1 % О. Лица с алкогольной кардиомиопатией исключались	qPCR	Потребление алкоголя не связано с длиной теломер в К. В О выявлено укорочение длины теломер при потреблении алкоголя; [119] 2013
Copenhagen City Heart Study; общая популяция датчан, обследованная в 1991–1994 гг. и повторно в 2001–2003 гг. (Дания)	38–68 на начало исследования, 47–76 при повторном обследовании; 4576 (из них 1943 М)	2069 человек с тяжелым уровнем потребления алкоголя (более 87,5 г этанола в неделю у Ж и более 175 г – у М)	qPCR	Употребление алкоголя не связано с длиной теломер как при поперечном, так и при продольном анализе; [17] 2013
Dutch famine birth cohort (Голландия), три группы	68,7±0,4; 45 (27 Ж); 67,4±0,2; 41 (20 Ж); 66,7±0,4; 45 (24 Ж)	Потребление более 1 дозы в неделю у 69 %	Q-FISH	Существенное укорочение теломер наблюдается у регулярно употребляющих крепкий алкоголь; пиво и вино такой связи не показывают; [120] 2015
Sympathetic Activity and Ambulatory Blood Pressure in Africans (SABPA I и II); учителя (Южная Африка)	42,0–54,0 и 44,0–58,0 для двух групп; 161 темнокожих и 180 белой расы	Число лиц, злоупотребляющих алкоголем: 61 (37,9 %) и 16 (8,9 %) для двух групп, определено по уровню гамма-глутамилтранспептидазы крови	qPCR	Меньшая длина теломер ассоциирована со злоупотреблением алкоголем; [106] 2015, [107] 2017
	49,77±8,67; 96 темнокожих и 107 белой расы	Средний уровень гамма-глутамилтранспептидазы крови – 42,28±57,7 U/л		

Продолжение таблицы 1.1

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
Korean Genome Epidemiology Study; в том числе носители полиморфизма ALDH2 rs2074356, исключая лиц с сердечно-сосудистыми и онкологическими заболеваниями (Ансан, Корея)	49–79; 1771 М и Ж	На основе опросников выделены абстиненты, группы малого (1–15 г/сут), среднего (16–30 г/сут) и высокого потребления этанола (>30 г/сут)	qPCR	Потребление этанола >30 г/сут обратно пропорционально средней длине теломер только у носителей мутантных аллелей ALDH2 (СТ и ТТ) rs2074356. Малый и средний уровни среднесуточного потребления имели положительную ассоциацию с длиной теломер у лиц с диким типом (СС) rs2074356; [103] 2016
	40–69; 1803 М и Ж	На основе опросников выделены абстиненты, группы очень малого (1–5 г/сут), малого (6–15 г/сут), среднего (16–30 г/сут) и высокого потребления этанола (>30 г/сут)		Потребление этанола >30 г/сут значимо связано с укорочением теломер у лиц 65 лет и старше, но не у более молодых. У пожилых людей, потребляющих более 5 г/сут, наблюдалось значительное укорочение длины теломер по сравнению с более молодыми людьми, потребляющими 1–5 г/сут; [108] 2017
Здоровые добровольцы (86 % европейцы) (Канада)	20–50; 205 (М) и 272 (Ж)	На основании опросника выделены 4 группы по потреблению: абстиненты (9 %), малого (68 %), умеренного (14 %) и высокого (8 %) потребления. Высокий уровень определен как более 10 и 15 доз этанола в неделю для Ж и М соответственно	qPCR	Отсутствие ассоциации между потреблением алкоголя и средней длиной теломер; [121] 2016

Продолжение таблицы 1.1

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
Netherlands Study of Depression and Anxiety; с 2004 по 2007 год (Голландия)	18–65; 2936 (33,6 % М) в начале и 1860 после 6-летнего наблюдения	На основании опросника выделены 3 группы: абстиненты (17 %), малого и среднего потребления (70,3 %, 1–14 и 1–21 доз этанола в неделю для Ж и М), высокого потребления (12,7 %, >14 доз этанола в неделю для Ж и >21 для М)	qPCR	В начале исследования высокое потребление алкоголя ассоциировано с более короткими теломерами, но ассоциация не была статистически значимой после поправок на другие факторы, а также в конце исследования [111] 2016
The Northern Finland Birth Cohort (1966, Финляндия)	31,2±0,3; 2,505 (М) и 2,700 (Ж)	Потребление алкоголя на основе опросника: медиана – 4,2, межквартильный диапазон – 1,1–10,9 г/сут	qPCR	Статистически значимый тренд по большей длине теломер при меньшем уровне потребления алкоголя [122] 2017
Госпитальные пациенты с урологической патологией (Италия)	О: 61,5±10,9; 96 М, больных раком мочевого пузыря; К: 60,3±11,7; 94 М без рака	О: 93,4±104 доз алкоголь-года; К: 107±117 доз алкоголь-года	qPCR	Потребление алкоголя ассоциировано с уменьшением длины теломер [123] 2017
The National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) (США)	К: 59,0±10,2; 121 М (53,7 % ALDH2*1/*2 и 12,4 % ALDH2*2/*2) О: 58,7±9,7; 134 М (44,8 % ALDH2*1/*2 и 0% ALDH2*2/*2)	К: 0–154 г/сут этанола на протяжении 0–52 лет; О: 18–330 г/сут этанола на протяжении 7–65 лет	TRF	Длина теломер примерно на 50 % короче у субъектов с алкогольной зависимостью. Различий в длине теломер у лиц с алкогольной зависимостью с аллелем гена ALDH2*2 и без него не было [104] 2019

Продолжение таблицы 1.1

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
Heart and Soul Study (HSS) и Cardiovascular Health Study (CHS); лица с кардиологической патологией (США)	HSS: К – 66,1±11,2; 321 (76,6 % М); О – 67,1±10,8; 627 (84,1 % М); CHS: К – 75,1±5,5; 883 (35,6 % М); О – 74,5±5,5; 790 (47,6 % М)	Различный уровень потребления на протяжении пяти лет исследования: К: абстиненты; О: потребляющие алкоголь	TRF	Потребление алкоголя не связано с увеличением или уменьшением длины теломер. Пьянство может уменьшить длину теломер [18] 2019
Лица, злоупотребляющие алкоголем, с вредными последствиями (DSM IV) и независимый здоровый контроль из базы Национального института по злоупотреблению алкоголем и алкоголизму США (NIAAA)	К: 33,32±0,56; 201 Ж и 248 М; О: 44,06±0,73; 73 Ж и 187 М	К: 7,83±0,58 доз алкоголя в неделю; О: 57,08±2,9 доз алкоголя в неделю. Общее потребление этанола за жизнь: К: 84 019±9423 г; О: 811344±55218 г. Число лет злоупотребления: К: 1,51±0,23; О: 14,9±0,79	qPCR	Укорочение теломер при наличии вредных последствий злоупотребления алкоголем как независимого от возраста фактора, так и в ассоциации с ним, при этом связи между длительностью хронического употребления алкоголя, потребленной дозой и длиной теломер не выявлено [105] 2019
Здоровые добровольцы и участники исследования DIALONG (Норвегия)	Когорта 1: 18–40; 53 (66 % Ж) Когорта 2: 51–81; 69 (55 % Ж)	На основе опросников 4 категории: трезвенники, употребляющие 1–14, 14–21 и >21 доз в неделю	qPCR	Отсутствие ассоциации длины теломер с потреблением алкоголя [124] 2020
DYNAMIC; добровольцы с гипертензией и без, ранее не получавшие лечения (Финляндия)	19–72 (средний – 45); 287 (М) и 279 (Ж)	Число доз алкоголя в неделю: 6,3±6,7 (М) и 2,7±3,8 (Ж)	TRF	Умеренное потребление алкоголя ассоциировано с меньшей длиной теломер, низкое потребление алкоголя связано с меньшей долей коротких теломер; [125] 2020

Продолжение таблицы 1.1

Участники, страна проведения	Возраст (лет), количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Метод	Результат исследования, источник и год
Cardiovascular Health Study (США)	≥65; 676 (М) и 972 (Ж)	Число доз алкоголя в неделю: от 1,9±4,4 до 2,3±5,1 в разных подгруппах, не разделенных по полу	TRF	Данные не приведены, ассоциации алкоголя с длиной теломер не установлено; [126] 2020
Жители США, представители разных рас (белая раса, темнокожие и латиноамериканцы) (США)	69,3±7,2; 749 (50,5 % Ж)	На основании опросников: не употребляющие алкоголь или редко употребляющие его (33,1 %); употребляющие ежемесячно (8,3 %); еженедельно (37,8 %); ежедневно (21 %)	qPCR	Легкое/умеренное потребление алкоголя (ежемесячно/еженедельно) связано с большей длиной теломер среди лиц белой расы; а еженедельное или ежедневное потребление алкоголя связано с более короткими теломерами среди темнокожих и латиноамериканцев; [112] 2021
Участники базы данных UK Biobank. Великобритания.	40–69; 407 участников, оба пола	Потребление алкоголя на основании опросников – от трезвости до злоупотребления, в среднем 18,35±16,92 г/сут	qPCR	Установлена ассоциация с укорочением длины теломер. Наибольшее значение имел факт потребления алкоголя до включения в исследование; [101] 2022

Примечание: О – опытная группа, К – контрольная группа, М – мужчины. Ж – женщины; * одна доза алкоголя соответствует стандартному алкогольному напитку с содержанием 10–12 г этилового спирта.

Таблица 1.2 – Данные клинических исследований об ассоциации алкоголя с длиной теломер соматических клеток

Характеристика групп	Возраст (лет); количество и пол	Анамнез потребления алкоголя	Биоматериал и метод	Результат исследования; источник; год
О: пациенты с алкогольной зависимостью (DSM-IV) без ЗНО; К: без ЗНО	О: 44–82 (средний – 61,2); 26 (М) К: 41–95 (средний – 73,3); 12 (М), 12 (Ж)	Нет данных	Слизистая оболочка пищевода. О: биопсийный материал	Меньшее теломерно-центромерное отношение в опытной группе; [127]; 2011
	О: 43–82 (средний – 62,3); 96 М (35 ALDH2*1/*1, 17 ALDH2*1/*2, 32 ADH1B*1/*2 или ADH1B*2/*2, 20 ADH1B*1/*1)	Нет данных	очагов, отрицательных при окрашивании йодом; К: аутопсийный материал; Q-FISH	Отсутствие различий в группах с разными генотипами. Меньшая длина теломер у пациентов с большим размером и множественными очагами; [128]; 2013
К: молодые (1) и взрослые (2); О: группа с дисплазией (1) и с карциномой in situ (2) слизистой оболочки ротовой полости	К: 0–18 (средний – 1,8); 6 М/4 Ж и 50–101 (средний – 75,4); 6 М/5 Ж О: 48–73 (средний – 59,8) 8 М/4 Ж и 35–99 (средний – 63,3) 11 М/12 Ж	К1: без опыта употребления алкоголя, К2: 7/2/2, О1: 4/0/2, О2: 12/2/8 (абстиненты, лица с умеренной и тяжелой степенью потребления, соответственно)	Слизистая оболочка ротовой полости после резекции или аутопсии; Q-FISH	Отсутствие различий в длине теломер у пьющих и непьющих; [109]; 2020
Близнецы, рожденные с 1969 по 1981 год, из исследования East Flanders Prospective Twin Survey (Бельгия)	22,8±3,2; 104 М и 107 Ж	По данным опросника: 5,4±7,9 доз в неделю	Клетки буккального эпителия; qPCR	Отсутствие связи между потреблением алкоголя и длиной теломер, ассоциация уровня гамма-глутамилтранспептидазы в сыворотке с более короткими теломерами; [129]; 2021
Пациенты 25 клиник Франции с 1997 по 2018 год (LICA-FR)	Старше 18 лет, средний – 54,8; 1502 пациента, 69,4 % М, 76 % с хронической болезнью печени, 978 с гепатоцеллюлярной карциномой	495 пациентов с хронической болезнью печени злоупотребляли и алкоголем	Опухолевые и нормальные гепатоциты; qPCR	Злоупотребление алкоголем как самостоятельный фактор, связанный с более короткой длиной теломер вне зависимости от пола; [130]; 2021

Проведенный анализ выявил противоречивость существующих данных, что подчеркивает необходимость дальнейшего изучения влияния алкоголя на длину теломер у человека с использованием современных, высокоточных методов ее измерения.

1.7 Методические проблемы определения длины теломер

1.7.1 Методы определения длины теломер

Важнейшим параметром теломер, наряду с последовательностью и структурой, является их длина, что определяет наличие большого разнообразия молекулярных, генетических и клеточно-биологических методов определения длины теломер, которые подробно рассмотрены в ряде работ [46]. К современным методам измерения длины теломер относятся как классические, так и высокочувствительные технологии, охватывающие широкий спектр аналитических подходов. Среди них анализ терминальных рестрикционных фрагментов (TRF, telomere restriction fragment), являющийся одним из первых и наиболее широко применяемых методов. Также активно используются варианты количественной полимеразной цепной реакции (qPCR), включая определение средней длины теломер как в относительных, так и в абсолютных единицах, а также ее усовершенствованная форма – монохромная мультиплексная qPCR (MMqPCR, monochrome multiplex qPCR).

Для более детальной оценки отдельных теломерных участков применяется количественная цифровая ПЦР в реальном времени (STAR, single telomere absolute-length rapid assay), позволяющая определять абсолютную длину отдельных теломер. Точные данные о длине единичных теломер могут быть получены методом STELA (single telomere length analysis) и его модификациями – U-STELA (universal STELA) и TeSLA (telomere shortest length assay), что особенно актуально для анализа коротких теломер.

Цитогенетические подходы включают флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) на метафазных хромосомах с последующим количественным анализом интенсивности сигнала (Q-FISH, quantitative FISH), а также проточную цитофлуориметрию (Flow-FISH), применяемую для оценки относительной длины теломер на уровне отдельных клеток. Для определения абсолютной длины теломер также используется метод молекулярного комбинга (TCA, telomere length combing assay), обеспечивающий визуализацию и измерение теломерных участков на вытянутых молекулах ДНК.

Каждый из этих методов обладает своими преимуществами, ограничениями и применим в зависимости от целей исследования, типа образца и требуемой точности [46,131–133].

Метод терминальных рестрикционных фрагментов (TRF) признан «золотым стандартом» для определения длины теломер и служит основой для сравнения с другими методами. Тем не менее между различными технологиями оценки длины теломер существует вариабельность. В частности, значения, полученные при помощи TRF, как правило, на ~7000 пар оснований превышают результаты, получаемые методом абсолютной количественной ПЦР. Это несоответствие объясняется тем, что TRF-метод охватывает не только непосредственно теломерные повторы, но и прилегающие субтеломерные участки, отличающиеся высокой генетической вариабельностью и неравномерной длиной [134].

Наиболее широко применяемые методы оценки длины теломер, такие как количественная ПЦР (qPCR), анализ терминальных рестрикционных фрагментов (TRF), количественная флуоресцентная гибридизация *in situ* (Q-FISH) и проточная цитофлуориметрия (Flow-FISH), преимущественно позволяют определить усредненные значения длины теломер, не отражая распределения по отдельным хромосомам или популяциям клеток [46,131–134].

Методы TeSLA и STAR обладают повышенной чувствительностью и специфичностью в выявлении укороченных теломер по сравнению с традиционными подходами. TeSLA позволяет детектировать распределение самых коротких теломер в диапазоне от менее 1 до приблизительно 18 тысяч пар оснований [132], а метод STAR охватывает значительно более широкий диапазон

– от 0,2 до 320 тысяч пар оснований [46], обеспечивая индивидуальную оценку длины отдельных теломер.

Несмотря на высокую информативность, на сегодняшний день методы TeSLA и STAR еще не были применены в эпидемиологических или клинических исследованиях, направленных на изучение влияния алкоголя на длину теломер, что подчеркивает необходимость дальнейших разработок и валидации этих технологий в соответствующем контексте (Таблица 1.3).

На сегодняшний день широкое внедрение измерения длины теломер в клиническую практику остается затруднительным ввиду наличия ряда нерешенных преаналитических и аналитических ограничений [16]. Среди существующих методик наиболее перспективным для клинического использования представляется метод STAR, поскольку он обеспечивает определение абсолютной длины отдельных теломер, обладает широким измерительным диапазоном, приемлем по трудозатратам и производительности, а также демонстрирует высокую степень воспроизводимости и потенциал для стандартизации (Таблица 1.3).

Таблица 1.3 – Различные методы определения длин теломер и их характеристика

Метод	Биоматериал (количество)	Определяемый параметр и диапазон метода	Источник
TRF	Ткань, клетки (большое)	Прямое определение средней абсолютной длины, распределение длин, 0,8–20 т.п.о.	[135]
Q-FISH/HT Q-FISH	Клетки, ткань (малое)	Косвенное определение средней абсолютной длины, распределение длин, 0,1–80 т.п.о.	[135,136]
Flow-FISH	Клетки (среднее)	Относительная или косвенная абсолютная средняя длина, 0,3–20 т.п.о.	[136]
STAR	Ткань, клетки (малое)	Косвенное определение абсолютной длины отдельных теломер, распределение длин 0,2–320 т.п.о.	[46]
TCA	Клетки (малое)	Прямое определение абсолютной длины всех теломер	[131]
STELA, U-STELA, TeSLA	Ткань, клетки (среднее)	Прямое определение абсолютной длины коротких теломер, распределение длин 0,4–20 т.п.о.	[133,135]
qPCR	Ткань, клетки (малое)	Относительная или косвенная абсолютная средняя длина, 10–1000 т.п.о.	[132,134]

Показано, что именно критически укороченные теломеры, а не средние значения их длины, играют ключевую роль в запуске клеточного ответа на повреждение ДНК. Такие теломеры способны инициировать необратимую остановку клеточного деления и ассоциированы с повышенным риском общей смертности [16,137]. В проспективном исследовании популяционной когорты среднего и пожилого возраста укорочение относительной длины теломер лейкоцитов являлось независимым фактором риска смерти от естественных причин в течение 15 лет [138]. В связи с этим интерпретация данных исследований, в которых выявлены статистические связи между различными патологиями и незначительными отклонениями средней длины теломер, требует осторожности, особенно если при этом не использовались высокочувствительные методы для оценки самых коротких теломер [139]. В большинстве проанализированных в настоящем обзоре публикаций оценка критически укороченных теломер либо не проводилась вовсе, либо осуществлялась с использованием метода TRF, ограниченного в чувствительности. Основное внимание в этих исследованиях было сосредоточено на измерении средней длины теломер, как в относительных, так и в абсолютных единицах, с применением таких методик, как TRF, Q-FISH и qPCR (Таблица 1.3). Отсутствие применения высокочувствительных методов в большинстве существующих работ не позволяет сделать окончательные выводы относительно изменений длины теломер в ответ на потребление алкоголя. В этой связи перспективным направлением является проведение дальнейших исследований с использованием современных технологий, таких как метод STAR, в сочетании с традиционными подходами (например, TRF и qPCR). Такой комбинированный подход позволит получить более точные и воспроизводимые данные, а также переоценить результаты ранних исследований с позиции новых методологических возможностей.

На текущий момент ни один из существующих методов измерения длины теломер не является универсальным – каждый обладает как преимуществами, так и ограничениями. Выбор подходящей методики должен определяться задачами

конкретного исследования, техническими возможностями лаборатории и доступностью оборудования. Оптимальным является подтверждение результатов с помощью альтернативного метода, однако такая верификация зачастую затруднена в силу ресурсных или организационных ограничений.

1.7.2 Этические и биологические проблемы определения длины теломер у людей при воздействии алкоголя

Проведение клинических исследований с участием здоровых добровольцев требует строгого соблюдения этических норм, особенно в случае исследования влияния психоактивных веществ, способных вызывать зависимость, в частности, этанола. Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации (WMA Declaration of Helsinki – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013) подчеркивает, что хотя медицинские исследования направлены на получение научных знаний, интересы, права и благополучие участников всегда должны оставаться главным приоритетом и не могут быть принесены в жертву ради научного прогресса.

Включение здоровых добровольцев в исследования, связанные с употреблением этанола, может подвергать их риску развития зависимости. Кроме того, в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 200н «Об утверждении правил надлежащей клинической практики», исследования должны быть научно обоснованными и этически приемлемыми, а потенциальная польза должна превышать возможный риск для испытуемых.

Таким образом, проведение исследований с использованием этанола на здоровых добровольцах представляется неэтичным: потенциальный вред от возможного развития зависимости перевешивает научную ценность таких исследований.

Исследования, посвященные алкоголизму, затруднены из-за сложности учета множества внешних факторов, включая уровень стресса, социальную изоляцию, экономическое положение и прочие факторы окружающей среды, способные влиять на результаты [140].

Важным аспектом является оценка всех факторов в хорошо контролируемых экспериментальных условиях, наиболее близких к человеческой популяции. Этим условиям удовлетворяет только модель на лабораторных приматах, так как она соответствует парадигме свободного потребления; при этом длительность хронической интоксикации и уровни потребления этанола сопоставимы с таковыми у людей, а сопутствующие потреблению этанола заболевания идентичны таковым у человека, одного из представителей отряда приматов [141]. Приматы, кроме человека, включая высших обезьян, рассматриваются как ключевые модельные организмы в биомедицинских исследованиях, включая изучение механизмов формирования алкогольной зависимости. Их уникальность определяется высокой степенью филогенетического родства с человеком, а также анатомическим, нейроэндокринным, иммунным, поведенческим и социальным сходством [41]. Человекообразные обезьяны не используются в лабораторных исследованиях в силу этических ограничений. Выбор же макаков резусов как модели, биологически очень близкой к *Homo sapiens*, позволяет воспроизвести некоторые аспекты комплексного психофизиологического феномена зависимости, которые невозможно продемонстрировать на других моделях. Сходство ферментативного аппарата и нейрохимии у всех приматов также облегчает задачу адекватной трактовки результатов.

Заключение по обзору

Анализ литературных данных показывает, что влияние хронического потребления этанола на теломеры остается недостаточно изученным. Этанол и продукты его метаболизма способны вызывать окислительный стресс, воспалительные реакции, митохондриальную дисфункцию и повреждение ДНК. Эти процессы могут быть связаны с нарушением поддержания длины теломер.

Однако имеющиеся данные не позволяют однозначно утверждать, что хроническое потребление этанола всегда сопровождается укорочением теломер.

В клинических исследованиях получены противоречивые результаты. Укорочение теломер при явном злоупотреблении алкоголем, т. е. при наличии нарушений здоровья, связанных с алкоголем, можно считать доказанным. Однако в части работ употребление алкоголя и алкогольная зависимость ассоциированы с уменьшением длины теломер, тогда как в других исследованиях такая связь не выявляется или зависит от уровня потребления этанола, пола, возраста, сопутствующих заболеваний и генетических особенностей метаболизма алкоголя. При этом эпидемиологические и клинические исследования имеют объективные ограничения: недостаточный контроль дозы и длительности воздействия, зависимость от анкетирования, этические ограничения. Существенным ограничением является то, что большинство исследований имеют поперечный характер. Группы лиц, употребляющих алкоголь, и лиц, не употребляющих его, трудно полностью сопоставить по курению, питанию, образу жизни, соматическому состоянию и другим факторам, способным влиять на длину теломер.

Экспериментальные исследования позволяют контролировать воздействие этанола, однако большинство из них выполнено на клеточных культурах и грызунах. Результаты таких работ не могут быть непосредственно перенесены на человека вследствие различий в метаболизме этанола, продолжительности жизни и особенностях теломерного аппарата. Исследования на лабораторных приматах, в которых непосредственно оценивается длина теломер при длительном потреблении этанола, в доступной литературе не выявлены.

Вместе с тем оценка длины теломер в периферической крови в условиях длительного эксперимента требует учета факторов, не связанных непосредственно с алкогольной нагрузкой. К ним относятся возраст животных, условия содержания, стресс адаптации к индивидуальной изоляции (содержание животных в индивидуальных клетках), а также изменения клеточного состава периферической крови. Средняя длина теломер, определяемая в лейкоцитах,

может изменяться не только вследствие процессов в теломерном аппарате отдельных клеток, но и вследствие изменения соотношения лейкоцитарных популяций.

Таким образом, остается неясным, сопровождается ли длительное добровольное потребление этанола самостоятельным изменением средней длины теломер у макаков резусов, зависит ли это изменение от индивидуального уровня потребления алкоголя и каков вклад условий содержания в наблюдаемую динамику показателя. Для ответа на эти вопросы необходимо продольное исследование в контролируемых условиях с регистрацией индивидуального потребления этанола и учетом гематологических показателей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Животные

Исследование выполнено в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, изложенными в директиве Европейского сообщества 2010/63/ЕС. Протокол формирования алкогольной мотивации был утвержден биоэтическим комитетом ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии» (протокол № 50 от 28.07.2020) и локальным этическим комитетом по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № 02-3 от 28.05.2025).

Материалом для работы послужила 121 особь макак резусов обоего пола и 10 самцов макак яванских, содержащихся в питомнике Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт» (ранее – ФГБНУ «НИИ МП», г. Сочи, Россия). Обезьяны происходят от предков, завезенных из Индии, Вьетнама, Китая и других регионов, либо из иных приматологических питомников. Все животные были рождены в питомнике и содержались в группах в открытых вольерах различной площади с доступом к утепленным внутренним помещениям.

Для анализа вклада изменения возраста при длительной алкоголизации животных как независимого от действия этанола фактора были использованы образцы венозной крови, собранные от 85 клинически здоровых макак резусов в возрасте от 1 до 24 лет (41 самка и 44 самца). Забор крови проводили в пробирки с К₂ЭДТА в ходе плановых ветеринарных осмотров без проведения дополнительных инвазивных вмешательств. Для оценки возможного влияния длительного хранения ДНК на результаты определения длины теломер дополнительно исследовали 22 образца ДНК, ранее выделенных из крови макак резусов и хранившихся в биобанке при –80 °С около двух лет. В качестве группы

сравнения использовали образцы ДНК, выделенные из биоматериала животных возрастной выборки непосредственно перед проведением анализа.

Эксперимент с хроническим алкогольным воздействием проведен на 36 здоровых самцах макак резусов в возрасте 8–16 лет, находящихся в фазе половой зрелости. Животные были переведены из уличных вольеров в индивидуальные клетки, изготовленные из нержавеющей стали и оснащенные системой отключения подачи воды. При этом сохранялся зрительный, слуховой и обонятельный контакт между особями, за исключением тактильного взаимодействия. Перед началом исследования все животные прошли карантин и адаптацию к новым условиям содержания. Питание животных было сбалансированным и включало комбикорм, произведенный по технологии компании «Altromin» (Германия), а также свежие овощи и фрукты.

Поскольку материал от макак резусов, участвовавших в эксперименте по потреблению этанола, получен при их индивидуальном содержании, для оценки возможного влияния изоляции на длину теломер были дополнительно использованы образцы крови от 10 самцов макак яванских (11–17 лет). Этот экспериментальный материал был получен после завершения основного диссертационного исследования в ходе работы по Комплексной теме 1 Ф-МП.2 «Исследование влияния стресса, связанного с социальным статусом и условиями содержания, на физиологические показатели и когнитивные функции половозрелых самцов макак яванских». Протокол эксперимента утвержден локальным этическим комитетом по вопросам биомедицинских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (протокол № 02-3 от 28.05.2025). До начала экспериментальных манипуляций самцы макак яванских содержались в устойчивых социальных группах по 3–4 особи, что обеспечивало им структурированную и предсказуемую социальную среду. Условия содержания и кормления соответствовали таковым для макак резусов при содержании в уличных вольерах в социальных группах. В рамках упомянутого исследования для моделирования хронического стресса, возникающего при нарушении социальных связей, животных переводили в индивидуальные клетки с полным

исключением контакта с ранее знакомыми особями. Это позволяет оценить влияние условий изолированного содержания на изменение длины теломер лейкоцитов. Первый забор крови проведен в период группового содержания для характеристики исходной длины теломер. Второй забор крови выполняли спустя 60 дней индивидуального содержания, условия которого воспроизводили режим, примененный в эксперименте с самцами макак резусов. Это обеспечило возможность оценить эффекты продолжительной социальной изоляции на исследуемый показатель длины теломер.

2.2 Моделирование хронического потребления алкоголя

Моделирование потребления алкоголя осуществляли согласно ранее апробированной нами методике [142], которая состоит из периода адаптации, этапа инициации алкогольной мотивации и этапа ее поддержания (Рисунок 2.1).

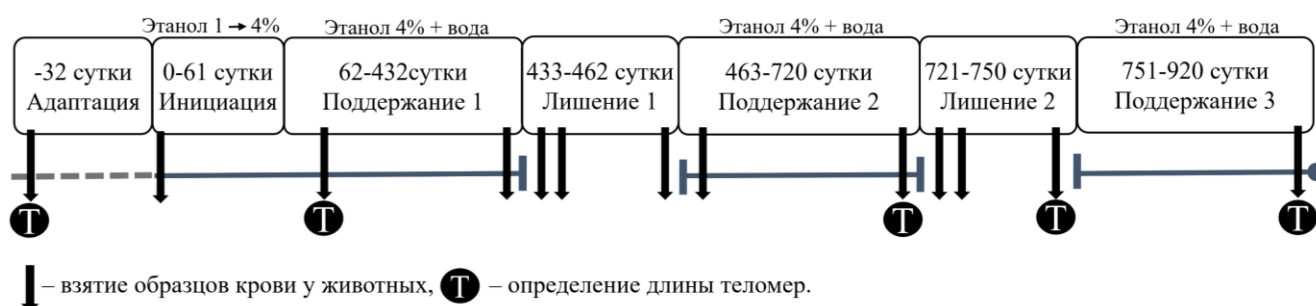


Рисунок 2.1 – Схема эксперимента по моделированию потребления этанола макаками резусами. Стрелками обозначено взятие крови

После завершения карантинного периода в течение 26 дней проводился этап адаптации, в ходе которого животных приучали к приему водного раствора с некалорийным подсластителем из индивидуальных поилок. Следующая фаза эксперимента – индукция алкогольной мотивации – начиналась с нулевого дня и продолжалась 62 дня. На данном этапе макакам ежедневно предоставляли доступ

к этанолсодержащему раствору (этанол с некалорийным подсластителем) на 1 час при полном отсутствии доступа к воде.

В качестве этанола использовали 95 % этиловый спирт для приготовления лекарственных форм (ООО «Константа-Фарм М», Россия). Из него готовили раствор требуемой концентрации по объему.

В первые 31 сутки постепенно повышали концентрацию этанола от 1 % до 4 %, одновременно увеличивая лимит суточной дозы с 0,5 г/кг до 2 г/кг массы тела. В последующие 31 сутки животные получали 4 % раствор этанола с подсластителем без количественных ограничений.

Далее эксперимент переходил в этап поддержания, на котором обезьянам круглосуточно (за исключением времени, необходимого для замены поилок) обеспечивался свободный доступ к 4 % раствору этанола без подсластителя наряду с неограниченным потреблением питьевой воды. Применение 4 % раствора этанола при наличии свободного выбора между этанолом и водой признано оптимальным режимом для устойчивого поддержания алкогольной мотивации у макаков резусов, что подтверждается данными предыдущих исследований других авторов [143]. На соответствующем этапе эксперимента были выполнены два периода лишения доступа к этанолу (абстиненции): с 433 по 462 сутки и с 721 по 750 сутки. Общая продолжительность эксперимента, начиная с момента первого предъявления этанола, составила 920 суток. В течение всего эксперимента ежедневно фиксировался объем потребляемого раствора, на основании чего рассчитывали среднесуточное потребление этанола в пересчете на килограмм массы тела животного. Данные доступны для 917 суток наблюдения.

Для углубленного анализа для каждого из 36 животных было рассчитано индивидуальное медианное значение суточного потребления этанола за первые 55 суток этапа «Поддержание 1». На основании этих индивидуальных медианных значений из общей выборки для длительного наблюдения отобрали животных с минимальным и максимальным уровнем потребления этанола. Сначала все 36 животных были разделены на 4 квартиля, далее из нижнего и верхнего квартилей ретроспективно сформированы две подгруппы: с наименьшим уровнем

потребления этанола (6 особей, НПЭ) и с наибольшим уровнем потребления (8 особей, ВПЭ). Это правомерно, т.к. известно, что макаки в модели со свободным выбором алкоголя характеризуются длительной категориальной стабильностью уровня потребления [144].

У представителей обеих подгрупп на различных этапах эксперимента отбирали образцы венозной крови для последующего анализа длины теломер лейкоцитов. Кроме того, выполняли гематологическое исследование, определяли концентрацию этанола в крови, уровень ТБК-реактивных продуктов и активность фермента каталазы.

2.3 Взятие крови и гематологический анализ

Забор венозной крови проводился утром в 9:00 (UTC+3:00) из подкожной вены плеча до начала кормления, без применения седативных средств. Образцы собирали в пробирки с К₂ЭДТА – для проведения гематологического анализа на автоматическом анализаторе HumaCount 30TS (Германия), а также в пробирки с активатором свертывания для последующего получения сыворотки и выполнения биохимических исследований.

Для расчета лейкоцитарной формулы изготавливали мазки крови, которые фиксировали и окрашивали по методу Май-Грюнвальда. Микроскопический анализ проводили с использованием масляной иммерсии (объектив $\times 100$, окуляр $\times 10$), подсчет клеток осуществляли с помощью отечественного счетчика СЛ-1 (Россия).

2.4 Ультразвуковое исследование

Для мониторинга соматических изменений ежегодно выполняли ультразвуковое исследование сердца и печени с использованием аппарата Chison

SonoTouch 60 с датчиками Chison MC6-E и Chison P6-E (Китай) под комбинированной анестезией тилетамина гидрохлоридом и золазепамом гидрохлоридом (Zoletil® 100, Virbac SA, Франция, 5 мг/кг) в сочетании с ксилазином гидрохлоридом (Xyla 2 %, Interchemie werken "De Adelaar" BV, Нидерланды, 2 мг/кг).

2.5 Методы ПЦР

На основании анализа литературы выбраны две методики определения средней длины теломер методом ПЦР:

1. методика Cawthon (2002) [133], позволяющая оценить относительную среднюю длину теломер (T/S);
2. методика O'Callaghan и Fenech (2011) [134], позволяющая определить абсолютную среднюю длину теломер (Рисунок 2.2).

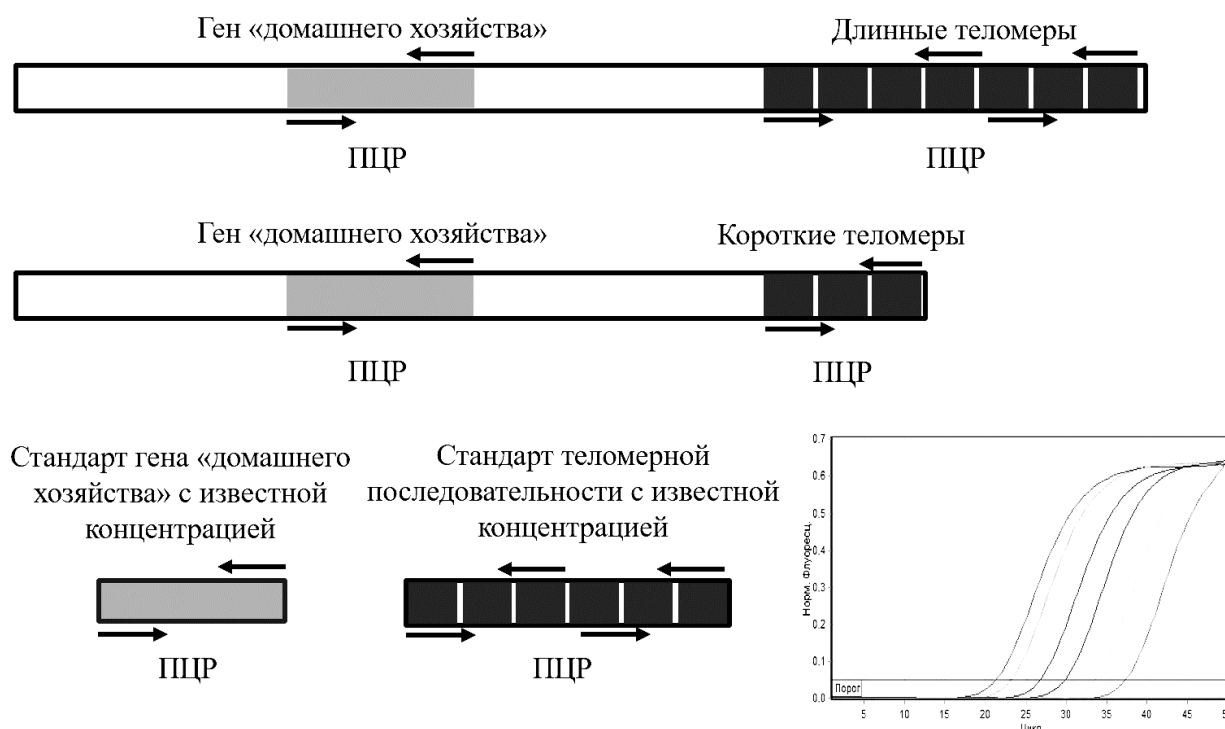


Рисунок 2.2 – Схематическое изображение метода измерения средней длины теломер с использованием ПЦР, предложенного O'Callaghan and Fenech, 2011

Проведено выделение нуклеиновых кислот из образцов крови, стабилизированных K_2EDTA . Выделение тотальной НК из лейкоцитов периферической крови проводили с применением коммерческого набора S-сорб (Синтол, Россия) согласно инструкции производителя.

Выделенные образцы ДНК хранили в герметичных пробирках с винтовой крышкой при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ до анализа.

Определяли среднюю длину теломер в образцах ДНК, полученных в фоновом периоде (-32 сутки опыта), периодах потребления (92, 717 и 917 сутки опыта) и лишения алкоголя (749 сутки опыта). Перед проведением ПЦР определяли концентрацию и отсутствие деградации нуклеиновых кислот путем разделения ДНК в агарозном геле с визуализацией бромистым этидием на многополосном трансиллюминаторе (Рисунок 2.3).

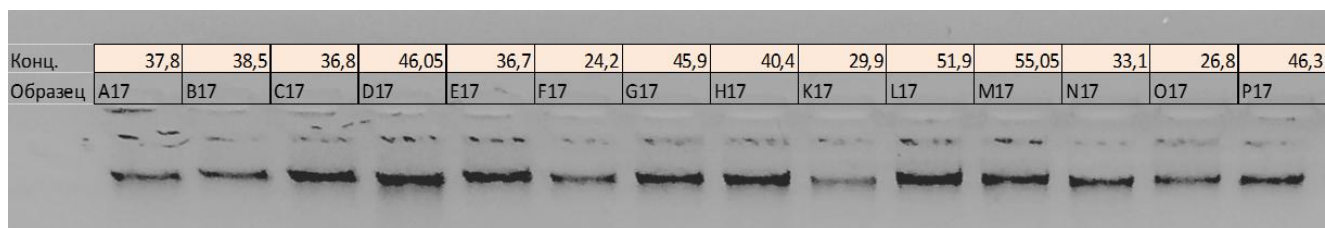


Рисунок 2.3 – Определение в агарозном геле отсутствия деградации ДНК

На этапе разработки метода проводили последовательную апробацию и оптимизацию состава реакционной смеси и параметров амплификации для определения абсолютной средней длины теломер методом количественной ПЦР. В различных вариантах реакции сравнивали ДНК-полимеразы и буферные системы, варьировали концентрации отдельных компонентов реакционной смеси, а также температурно-временные параметры амплификации. Аналитические характеристики отобранных вариантов реакции оценивали с использованием серий последовательных разведений синтетического стандарта теломерной последовательности и образцов геномной ДНК. Для каждого варианта анализировали характер кривых амплификации, закономерность изменения

значений порогового цикла при изменении количества матрицы, линейность зависимости C_t от логарифма концентрации стандарта, рабочий диапазон количественного определения и воспроизводимость результатов. Специфичность амплификации контролировали путем электрофоретического разделения продуктов ПЦР в агарозном геле; критерием служило наличие продукта ожидаемого размера при отсутствии выраженных неспецифических продуктов. На основании совокупности полученных данных были выбраны состав реакционной смеси и режим амплификации, использованные при последующем анализе экспериментальных образцов ДНК.

При выборе однокопийного гена в качестве кандидатов рассматривали ген β -глобина и ген 36B4. По данным литературы, в реакции с внесением 35 нг ДНК человека при 30 циклах ПЦР на амплификацию ДНК гена 36B4 получен только ожидаемый продукт размером 74 п.о. [134]. Для определения относительной длины теломер нами также был выбран ген 36B4 по причине выхода кривых флуоресценции на плато на более ранних циклах и отсутствия неспецифических продуктов амплификации в отрицательном контроле.

ДНК-пробы приводили к единой концентрации на основании данных, полученных с использованием спектрофотометра IMPLEN NanoPhotometer NP80, а также по результатам постановки контрольной ПЦР-реакции с праймерами к гену β -глобина и зондом, меченным флуоресцентным красителем ROX. Проводилась оптимизация состава реакционной смеси с целью повышения эффективности амплификации.

В ходе оптимизации условий была установлена следующая температурная программа амплификации, применяемая для определения как абсолютной, так и относительной длины теломер:

1. начальная активация ДНК-полимеразы – 95 °C, 15 минут;
2. 30 циклов:
 - денатурация – 95 °C, 20 секунд,
 - отжиг праймеров – 65 °C, 25 секунд,
 - синтез цепи – 72 °C, 40 секунд;

3. регистрация флуоресценции осуществлялась при температуре 65 °С по зеленому каналу;

4. заключительная стадия элонгации – 72 °С.

Амплификацию для определения длины теломер относительно однокопийного гена проводили в следующей итоговой реакционной смеси:

1. Амплификация теломерных последовательностей: Общий объем смеси 30 мкл включает ДНК - 5 мкл (4 нг/мкл), полимеразу TaqF - 0,5 мкл (2,5 Е.А.), буфер 10x taq turbo buffer (Mg 25 mM) - 3 мкл, смесь dNTP - 0,2 мкл (по 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dUTP), краситель интеркалирующий 10x sybr - 1 мкл, вода для ПЦР, свободная от нуклеаз, до 30 мкл.

2. Амплификация гена 36B4: Общий объем смеси 30 мкл включает ДНК - 5 мкл (4 нг/мкл), полимеразу TaqF - 0,5 мкл (2,5 Е.А.), буфер 10x taq turbo buffer (Mg 25 mM) - 3 мкл, смесь dNTP - 0,1 мкл (по 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dUTP), краситель интеркалирующий 10x sybr - 1 мкл, вода для ПЦР, свободная от нуклеаз.

Использовали следующие последовательности праймеров (ЗАО «Евроген»):

1.1) Ctel1: GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT 0,05 мкл (количество в смеси 5 пкМоль, концентрация в смеси 0,167 пкМоль/мкл, эквивалентно 0,167 мкМ либо 167 нМ);

1.2) Ctel2: TCCCGACATCCSTATCCSTATCCSTATCCSTATCCSTATCCSTA 0,15 мкл (количество в смеси 15 пкМоль, концентрация в смеси 0,5 пкМоль/мкл, эквивалентно 0,5 мкМ либо 500 нМ).

2.1) 36B4F: CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC 0,1 мкл (количество в смеси 10 пкМоль, концентрация в смеси 0,333 пкМоль/мкл, эквивалентно 0,333 мкМ либо 333 нМ)

2.2) 36B4R: CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA 0,1 мкл (количество в смеси 10 пкМоль, концентрация в смеси 0,333 пкМоль/мкл, эквивалентно 0,333 мкМ либо 333 нМ).

Для определения абсолютной средней длины теломер использовали следующие последовательности стандартов (ЗАО «Евроген»), синтезированных с очисткой высокоэффективной жидкостной хроматографией:

36B4: 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTCTCCACAGACAAGGCCAGGA
CTCGTTTGTACCCGTTGATGATAGAATGGG -3'

Telo: (TTAGGG)¹⁴

В качестве стандартного образца для контроля воспроизводимости между постановками использовали суммарный образец ДНК, полученный путем объединения равных количеств ДНК всех исследуемых образцов.

Количество нуклеотидных повторов теломер в реакции определяли на основании значения порогового цикла амплификации путем интерполяции по стандартной кривой и выражали в тысячах пар оснований:

$$L_{\text{тел}} = f(Ct_{\text{тел}})$$

где $L_{\text{тел}}$ – суммарная длина теломерной последовательности в реакции, $Ct_{\text{тел}}$ – пороговый цикл амплификации, f – функция стандартной кривой.

Число диплоидных наборов в реакции определяли по значению порогового цикла однокопийного гена:

$$N_{\text{геном}} = g(Ct_{\text{ген}})$$

где $N_{\text{геном}}$ – число диплоидных геномных копий, $Ct_{\text{ген}}$ – пороговый цикл амплификации однокопийного гена, g – функция стандартной кривой.

Абсолютную длину теломер L рассчитывали по формуле:

$$L = \frac{L_{\text{тел}}}{N_{\text{геном}}}$$

Полученное значение соответствовало суммарной длине теломерных последовательностей на диплоидный геном. Для расчета средней длины теломер суммарную длину теломерных последовательностей дополнительно делили на количество хромосомных концов в диплоидном геноме изучаемого вида. Результаты выражали в тысячах пар оснований.

Все реакции количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени проводили в трех технических повторностях, результат усредняли. В

анализ включали только образцы, для которых стандартное отклонение значений порогового цикла между повторностями не превышало одного цикла, а значения амплификации находились в линейном диапазоне стандартных кривых.

2.5.1 Оценка влияния хранения выделенной ДНК на определение длины теломер в ней

Для оценки возможного влияния хранения выделенной ДНК на определение средней длины теломер проведено сравнительное исследование образцов, выделенных и хранившихся в сопоставимых условиях разное время. В первую группу включили 22 образца ДНК, выделенные из периферической крови самцов макаков резусов и хранившиеся около двух лет в условиях, идентичных условиям хранения образцов основного эксперимента (-80°C). Во вторую группу включили 22 образца свежевыделенной ДНК от самцов макаков резусов, сопоставимых по возрасту (10–19 лет) и содержавшихся в сопоставимых условиях. Все животные содержались в группах в открытых вольерах. Выделение ДНК в обеих группах проводили идентичным методом. Определение абсолютной средней длины теломер выполняли методом ПЦР в единой серии с использованием одинаковых условий амплификации. Для сравнения показателей между независимыми группами использовали t-критерий Стьюдента.

2.6 Биохимические исследования сыворотки крови

Определение концентрации этанола в сыворотке крови проводилось с использованием ферментативного метода и диагностического набора Этанол-Ольвекс (ООО «Ольвекс диагностикум», Россия). Уровень веществ, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-продуктов), определяли с применением набора ТБК-Агат (ООО «Агат-Мед», Россия). Активность каталазы в сыворотке оценивали ферментативным методом с использованием набора Catalase A007-1 (Cloud-Clone Corp., США). Реакции проводили в двух повторностях, результат

усредняли. Измерение оптической плотности растворов осуществляли с помощью спектрофотометра IMPLEN NanoPhotometer NP80 (Германия) с использованием одноразовых кювет с длиной оптического пути 10 мм и рабочим объемом от 0,5 мл (Aptaca S.p.A., Италия).

Методом иммуноферментного анализа в сыворотке крови определяли содержание кортизола и дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭА-С) (наборы ООО «ХЕМА», Москва) на анализаторе MultiskanEX (ThermoElectron Corporation, Германия) в соответствии с инструкциями, прилагаемыми к наборам.

Для определения прочих биохимических показателей использовали наборы High Technology, Inc. (ООО «Бизнес Технологии», Россия), а анализ выполняли в соответствии с инструкциями производителя на совместимом полуавтоматическом биохимическом анализаторе Biochem SA.

2.7 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, 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 $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Результаты использования статистических критериев проверки нормальности распределения зависимых переменных

В таблице 3.1 приведены результаты оценки нормальности распределения данных оцениваемых показателей. В отношении длины теломер не для всех наборов данных соблюдалось нормальное распределение. Учитывая, что для интактных самцов и общей группы алкоголизированных животных тест Колмогорова–Смирнова подтвердил нормальность распределения, статистический анализ выполнен с использованием параметрических критериев.

Таблица 3.1 – Соответствие показателей нормальному закону распределения

Показатель	Тест Колмогорова–Смирнова, значение p		Тест Шапиро–Уилка, значение p	
Параметры с нормальным и близким к нему распределением				
Группа	36 самцов		36 самцов	
Потребление этанола, г/кг/сут (медианные значения)	0,0982 (n=36)		0,9473 (n=36)	
Группа	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Длина теломер т.п.о. (интактные макаки резус)	>0,1000 (n=44)	0,0135 (n=41)	0,3653 (n=44)	0,0018 (n=41)
	0,0074 (n=85)		0,0019 (n=85)	
Группа	ВПЭ	НПЭ	ВПЭ	НПЭ
Длина теломер т.п.о. (опыт с алкоголем)	0,0174 (n=40)	>0,1000 (n=30)	0,0027 (n=40)	0,5717 (n=30)
	>0,1000 (n=70)		0,4015 (n=70)	

Продолжение таблицы 3.1.

Показатель	Тест Колмогорова– Смирнова, значение p		Тест Шапиро–Уилка, значение p	
Группа	ВПЭ	НПЭ	ВПЭ	НПЭ
Параметры с нормальным распределением				
Лейкоциты, $\times 10^9/\text{л}$	>0,1000 (n=32)	>0,1000 (n=24)	0,1812 (n=32)	0,8854 (n=24)
Нейтрофилы, %	>0,1000 (n=32)	0,0786 (n=24)	0,7124 (n=32)	0,5014 (n=24)
Лимфоциты, %	>0,1000 (n=32)	>0,1000 (n=24)	0,8261 (n=32)	0,7001 (n=24)
Моноциты, %	>0,1000 (n=32)	>0,1000 (n=24)	0,7646 (n=32)	0,5528 (n=24)
Содержание этанола в крови, мг/дл	>0,1000 (n=32)	0,0577 (n=24)	0,0550 (n=32)	0,0295 (n=24)
Эритроциты, $\times 10^{12}/\text{л}$	>0,1000 (n=80)	0,0653 (n=60)	0,2135 (n=80)	0,6293 (n=60)
Параметры с ненормальным распределением				
Потребление этанола, г/кг/сут (индивидуальные значения)	<0,0001 (n=2600)	<0,0001 (n=1906)	<0,0001 (n=2600)	<0,0001 (n=1906)
Каталазная активность сыворотки крови, Ед/мл	<0,0001 (n=86)	<0,0001 (n=68)	<0,0001 (n=86)	<0,0001 (n=68)
ТБК-активные продукты сыворотки крови, мкмоль/л	0,0001 (n=96)	<0,0001 (n=72)	<0,0001 (n=96)	<0,0001 (n=72)

3.2 Потребление этанола и соматические изменения

Исходная характеристика животных групп НПЭ и ВПЭ приведена в таблице 3.2. Различий между группами по оцененным анатомо-физиологическим параметрам в начале опыта не наблюдалось.

Таблица 3.2 – Характеристика животных двух исследованных групп на 0-е сутки эксперимента ($M \pm m$)

Показатель	Группа НПЭ	Группа ВПЭ	Значимость различий
Возраст, годы	11,0 $\pm$ 0,7	12,3 $\pm$ 0,4	p=0,132
Масса тела, кг	9,7 $\pm$ 0,3	10,2 $\pm$ 0,3	p=0,206
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,0 $\pm$ 1,5	10,9 $\pm$ 1,4	p=0,152
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,9 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,2	p=0,108
Кортизол, нг/мл	585 $\pm$ 27	575 $\pm$ 29	p=0,803
ДГЭА-С, нг/мл	2708 $\pm$ 849	3306 $\pm$ 488	p=0,524

В ходе эксперимента осуществлялась количественная оценка суточного потребления этанола животными. Расчетные значения показали, что медианные уровни потребления этанола существенно различались между подгруппами с низким (НПЭ) и высоким (ВПЭ) потреблением, что подтверждает стабильное формирование различий в мотивации к потреблению алкоголя у животных этих групп (Рисунок 3.1). В первом периоде фазы поддержания медианные значения суточного потребления этанола у отдельных животных группы с низким потреблением (НПЭ) варьировали от 0,14 до 0,94 г/кг/сут., тогда как в группе с высоким потреблением (ВПЭ) – от 1,92 до 3,03 г/кг/сут. В дальнейшем уровень потребления оставался стабильным с незначительной тенденцией к увеличению.

Таким образом, при использовании модели со свободным доступом к этанолу уровень сформированной алкогольной мотивации у макак резусов демонстрирует высокую устойчивость и сохраняется на протяжении

продолжительного экспериментального периода [144]. В ходе эксперимента в обеих подгруппах, как с низким, так и с высоким уровнем потребления, отмечалось постепенное увеличение медианных значений суточного потребления алкоголя, что может отражать динамическое усиление алкогольной мотивации при длительном свободном доступе к этанолу (Рисунок 3.1).

Следует сопоставить уровень потребления этанола у макак резусов с таковым для человека. В эпидемиологических исследованиях принято пересчитывать потребляемые различные алкогольные напитки в число стандартных доз алкоголя. Стандартная доза для разных стран определяется как эквивалент от 8 до 17 г чистого этанола на один напиток, но в большинстве стран соответствует 10 г. Для животных, включенных в группу с высоким потреблением (ВПЭ), уровень потребления в 3,03 г/кг при массе тела порядка 10 кг составляет 30,3 г чистого спирта в сутки. В руководстве Центра оценки и исследований лекарственных средств (CDER) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) «Оценка максимальной безопасной начальной дозы в клинических испытаниях терапевтических средств у здоровых взрослых» принято, что коэффициент пересчета доз для макак составляет 3,1. Таким образом, потребление группы ВПЭ эквивалентно 59 г чистого этанола для человека массой тела 60 кг или 5–6 стандартным дозам в сутки (35–42 стандартным дозам в неделю), что превышает рекомендуемый «безопасный» уровень в 3 стандартные дозы в день для мужчин. При этом важным является и достигаемый уровень этанола в крови, поскольку он определяет токсикологические эффекты этанола.

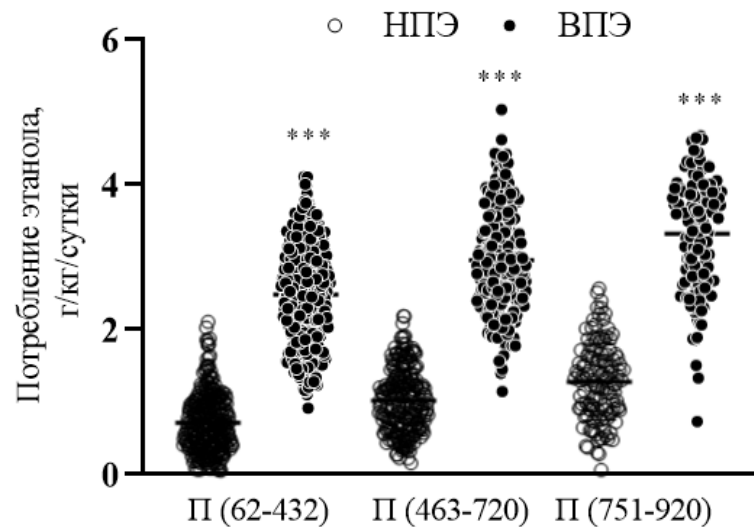


Рисунок 3.1 – Уровень потребления этанола животными. П – период поддержания алкогольной мотивации, в скобках указаны сутки опыта. НПЭ – группа низкого потребления этанола. ВПЭ – группа высокого потребления этанола. Приведены индивидуальные значения, горизонтальной линией отмечена медиана. *** – $p < 0,001$, отличия между группами на данный срок наблюдения

Средний уровень этанола в сыворотке крови животных (Рисунок 3.2) статистически значимо различался между подгруппами с низким (НПЭ) и высоким (ВПЭ) потреблением в периоды поддержания 2 и 3. Во втором периоде поддержания значения составили 37 ± 4 мг/дл для группы НПЭ и 77 ± 10 мг/дл для группы ВПЭ ($p < 0,05$), а в третьем – 8 ± 2 мг/дл и 53 ± 14 мг/дл соответственно ($p < 0,001$). Максимально зарегистрированный уровень этанола в крови составил 160 мг/дл. Это соответствует легкой степени алкогольного опьянения для человека.

При этом наблюдалась выраженная индивидуальная вариабельность внутри каждой подгруппы, что, вероятно, связано с неравномерным распределением потребления этанола в течение суток, тогда как забор крови проводился строго в фиксированное утреннее время. Ранее нами было показано, что у макаков резусов формируется выраженный циркадианный ритм потребления алкоголя с акрофазой примерно в 15:00 (UTC+3:00) [145]. Это позволяет предположить, что в

настоящем исследовании фактический пик концентрации этанола в крови мог быть не зафиксирован. В течение всего наблюдаемого периода клинических признаков алкогольной интоксикации у животных не отмечалось.

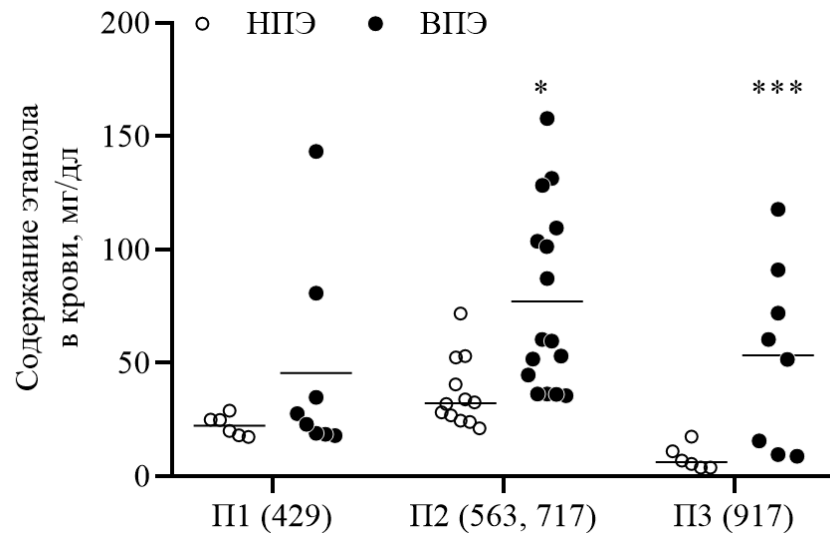


Рисунок 3.2 – Содержание этанола в сыворотке крови животных. П – период поддержания алкогольной мотивации, в скобках указаны сутки опыта. НПЭ – группа низкого потребления этанола. VPЭ – группа высокого потребления этанола. Приведены индивидуальные значения, горизонтальной линией отмечено среднее значение. *, *** – $p < 0,05$, $p < 0,001$, отличия между группами на данный срок наблюдения

Уровень потребления коррелировал с содержанием этанола в крови животных ($r=0,62$, $p < 0,001$, Рисунок 3.3).

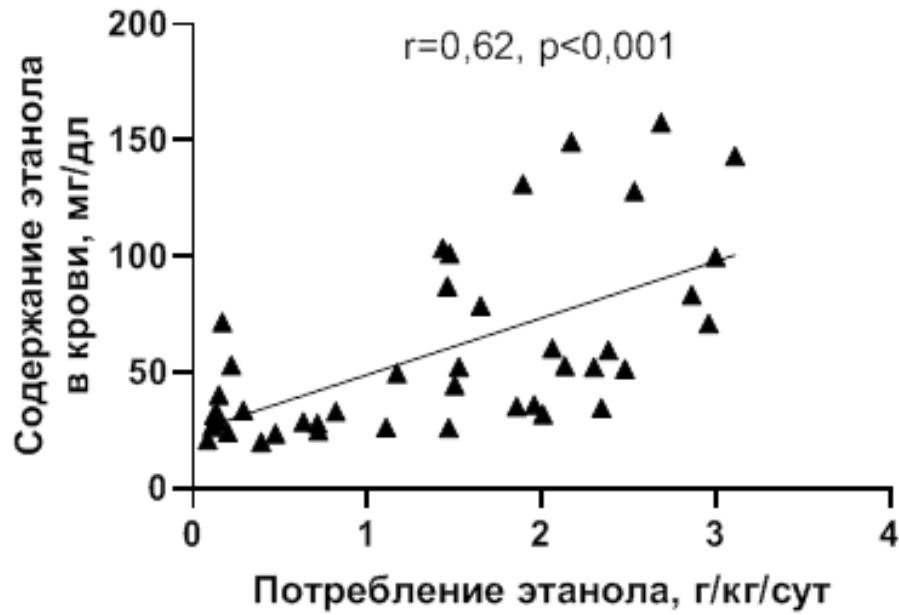


Рисунок 3.3 – Корреляция показателей «Потребление этанола» и «Концентрация этанола в крови». Приведен коэффициент корреляции Пирсона

У животных группы ВПЭ наблюдалось снижение массы тела (Рисунок 3.4) на 9 % к 722 суткам по сравнению с исходным значением ($p=0,030$), тогда как в группе НПЭ значимых изменений массы тела не зафиксировано.

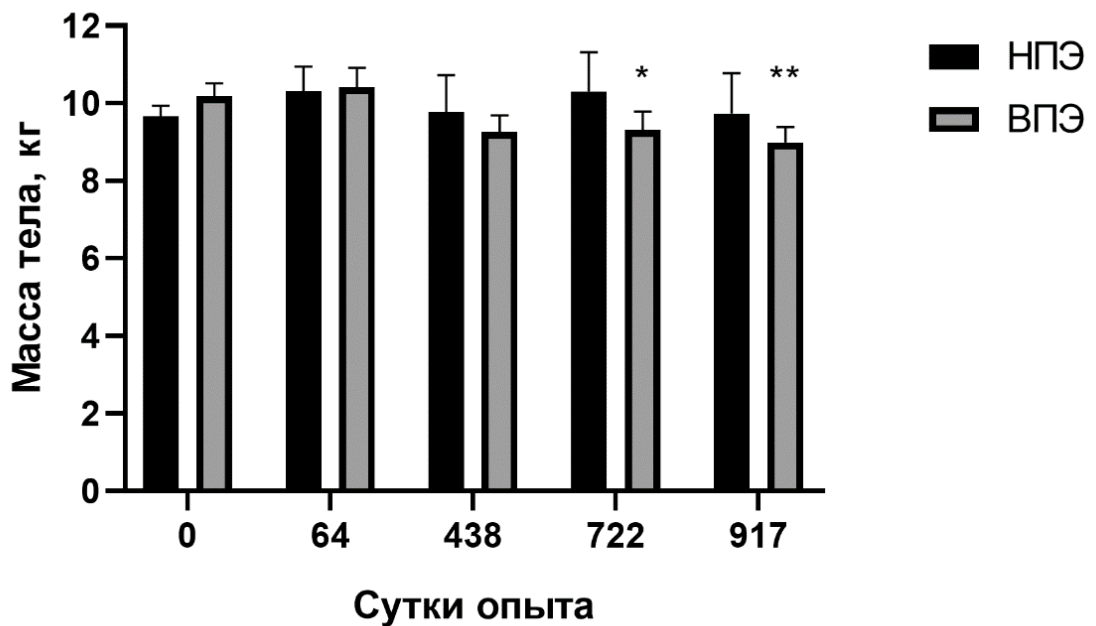


Рисунок 3.4 – Масса тела животных

По данным ультразвукового исследования печени изменений эхогенности паренхимы и других признаков, свидетельствующих о развитии гепатита и жировой дистрофии, не наблюдали. Эхокардиография не показала отклонений в функции и морфологии левого желудочка сердца на различных этапах эксперимента.

В периодах лишения доступа к этанолу у животных не наблюдалось выраженных изменений клинического состояния. Отсутствовали признаки, характерные для абстинентного синдрома, такие как рвота, тремор, пилоэрекция, а также поведенческие маркеры дистресса, включая социальное отстранение (например, сидячая поза в задней части клетки с утратой реакции на внешние стимулы).

Длительное потребление этанола привело к некоторым биохимическим изменениям (таблица 3.3):

- отмечено увеличение активности гамма-глутамилтранспептидазы в группе ВПЭ с 717 суток опыта;
- в группе ВПЭ наблюдалось увеличение уровня триглицеридов, начиная с 92 суток опыта. При этом межгрупповые различия наблюдались с 717 суток;
- в обеих группах отмечено снижение общего холестерина, которое в группе ВПЭ наблюдали с 429 суток, а в группе НПЭ только с 717 суток;
- в обеих группах наблюдалось увеличение уровня общего билирубина к 917 суткам, несколько более выраженное в группе ВПЭ.

Изменений активности АЛТ, АСТ, щелочной фосфатазы, содержания глюкозы и общего белка не наблюдали (данные не приведены, получены Киргинцевым Р.М.).

Данные изменения свидетельствуют о функциональных изменениях в печени, в частности о развитии нарушений жирового метаболизма и холестаза.

Таблица 3.3 – Биохимические параметры сыворотки крови животных двух исследованных групп ($M \pm m$)

Группа	Этап и сутки эксперимента					
	Фон	Поддержание				
	0	92	429	563	717	917
Гамма-глутамилтранспептидаза, Ед/л						
НПЭ (n=6)	74±12	64±4	81±16	92±8	75±5	89±8
ВПЭ (n=8)	72±5	78±11	78±13	83±6	104±13 *	106±14 *
Триглицериды, ммоль/л						
НПЭ (n=6)	0,7±0,3	0,5±0,1	0,8±0,1	0,6±0,1	0,9±0,3 ##	0,9±0,3 ##
ВПЭ (n=8)	0,5±0,1	1,1±0,2 *	1,4±0,2 **	1,0±0,2 *	1,7±0,2 **	2,7±0,3 **
Холестерин общий, ммоль/л						
НПЭ (n=6)	4,6±0,4	4,7±0,4	3,5±0,1	3,8±0,7	2,7±0,3 *	3,4±0,7 **
ВПЭ (n=8)	4,5±0,3	4,5±0,2	3,3±0,2 **	3,0±0,5 **	2,8±0,1 **	3,2±0,6 **
Билирубин общий, мкмоль/л						
НПЭ (n=6)	6,6±2,4	4,4±0,6	6±3,3	15,3±3,9 *	3,5±1,4	14,7±5,7 *
ВПЭ (n=8)	5,7±1,2	6,4±0,6	4,3±1,8	10,9±3,4	6,7±2	19,1±2,8 **
Данные получены совместно с Киргинцевым Р.М. *, ** – $p < 0,05$, $p < 0,01$ при сравнении с 0-ми сутками внутри группы, ## – $p < 0,01$ при сравнении между группами						

3.3 Результаты гематологического анализа

Общее количество лейкоцитов на протяжении эксперимента оставалось стабильным и не демонстрировало статистически значимых изменений. Однако в лейкоцитарной формуле были зафиксированы динамические сдвиги,

представленные на Рисунках 3.5–3.8. На начальном этапе наблюдались межгрупповые различия по относительному содержанию лимфоцитов и нейтрофилов, которые к завершению эксперимента нивелировались.

К концу наблюдаемого периода отмечалось увеличение доли моноцитов в обеих группах по сравнению с исходным уровнем, что может свидетельствовать о формировании провоспалительного профиля крови (Рисунок 3.7). При этом отсутствие относительного моноцитоза на 749-е сутки, спустя 29 дней после прекращения доступа к алкоголю, указывает на обратимый характер выявленных изменений.

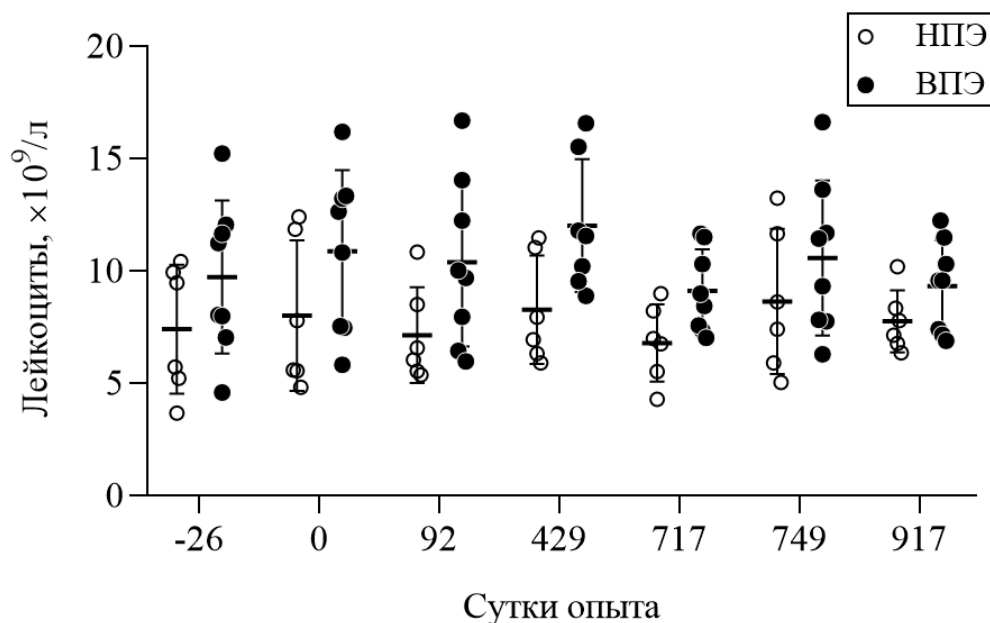


Рисунок 3.5 – Содержание лейкоцитов в крови у самцов макаков резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола. НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола

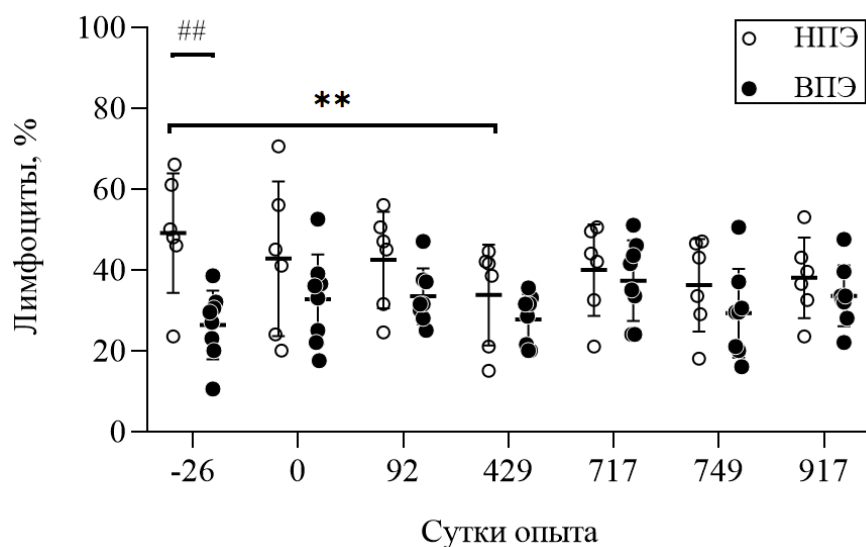


Рисунок 3.6 – Содержание лимфоцитов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола. НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола, ** – $p < 0,01$ при сравнении внутри группы, ## – $p < 0,01$ при сравнении между группами

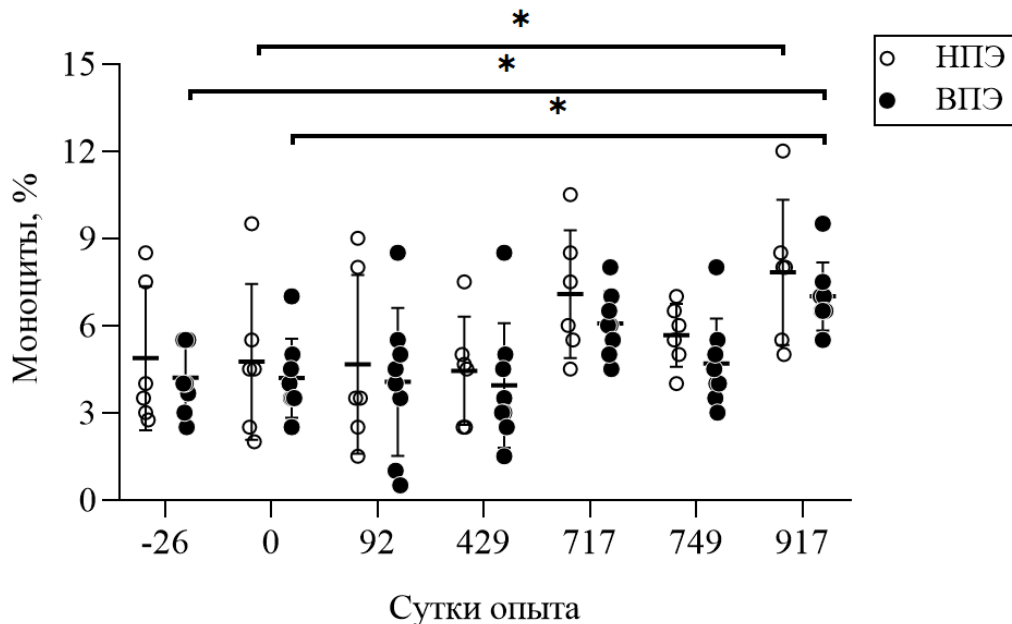


Рисунок 3.7 – Содержание моноцитов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола. НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола, * – $p < 0,05$ при сравнении внутри группы

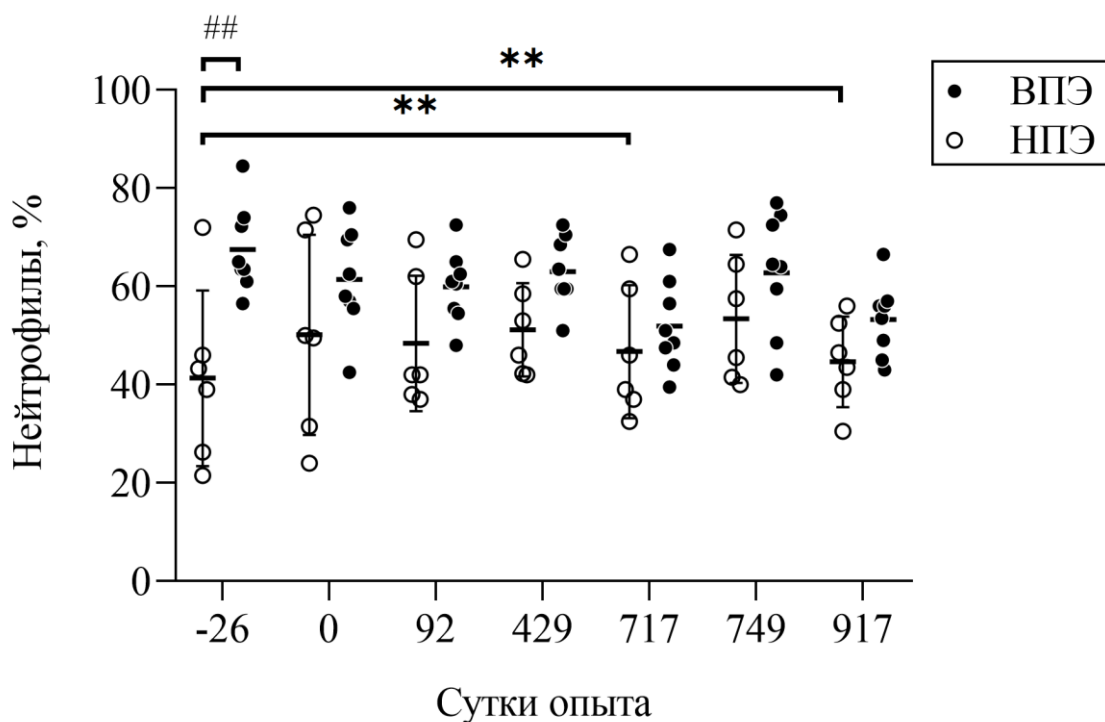


Рисунок 3.8 – Содержание нейтрофилов в крови у самцов макак резусов: –26 и 0 сутки – фоновые значения, 92, 429, 717 и 917 сутки – этапы поддержания алкогольной мотивации, 749 сутки – период лишения этанола, НПЭ – группа низкого потребления этанола, ВПЭ – группа высокого потребления этанола, ** – $p < 0,01$ при сравнении внутри группы, ## – $p < 0,01$ при сравнении между группами

На третьи сутки как первого, так и второго периода абстиненции в группе с высоким потреблением этанола (ВПЭ) наблюдалось снижение числа эритроцитов в периферической крови (Рисунок 3.9). Особенно выраженным это снижение было во второй абстинентный период, когда в подгруппе ВПЭ фиксировалось статистически значимое уменьшение гематокритного показателя до $44,2 \pm 1,0 \%$, что значимо ниже как по сравнению с исходным уровнем в данной группе ($50,3 \pm 2,1 \%$; $p < 0,05$), так и относительно значений в подгруппе с низким потреблением (НПЭ) на тот же срок ($48,0 \pm 2,3 \%$; $p < 0,05$). В остальные временные точки статистически значимых различий по уровню гематокрита как внутри групп, так и между ними выявлено не было.

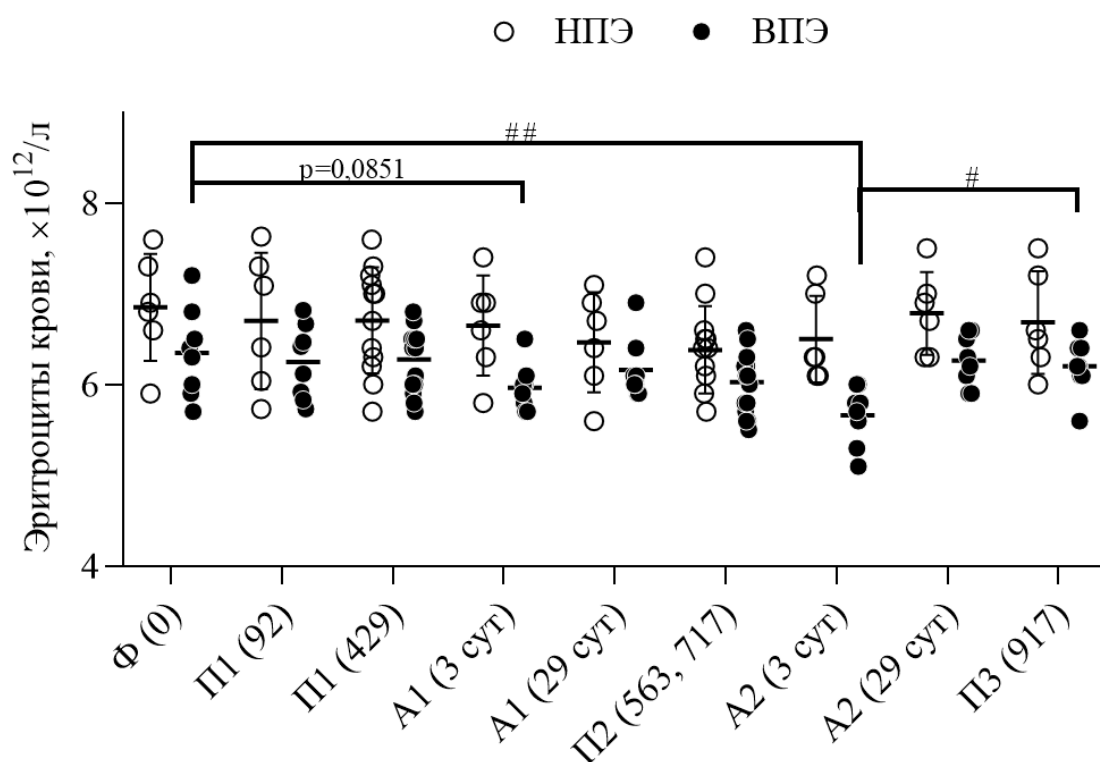


Рисунок 3.9 – Количество эритроцитов в крови животных на разных сроках опыта. Ф – адаптационный период, П – период поддержания алкогольной мотивации, А – абстинентный период, арабской цифрой у литеры обозначен номер периода, в скобках указаны сутки опыта или периода лишения алкоголя. НПЭ – группа низкого потребления этанола. ВПЭ – группа высокого потребления этанола. Данные приведены в виде среднего значения и ошибки среднего. #, ## - $p < 0,05$, $p < 0,01$, отличия внутри групп для разных этапов опыта

3.4 Показатели окислительного стресса

Оценка состояния антиоксидантной системы организма осуществлялась на основании измерений активности каталазы в сыворотке крови (Рисунок 3.10). В ходе эксперимента отмечались колебания этого показателя внутри исследуемых групп, однако они не достигали статистически значимого уровня по сравнению с фоновыми значениями, зафиксированными в адаптационный период.

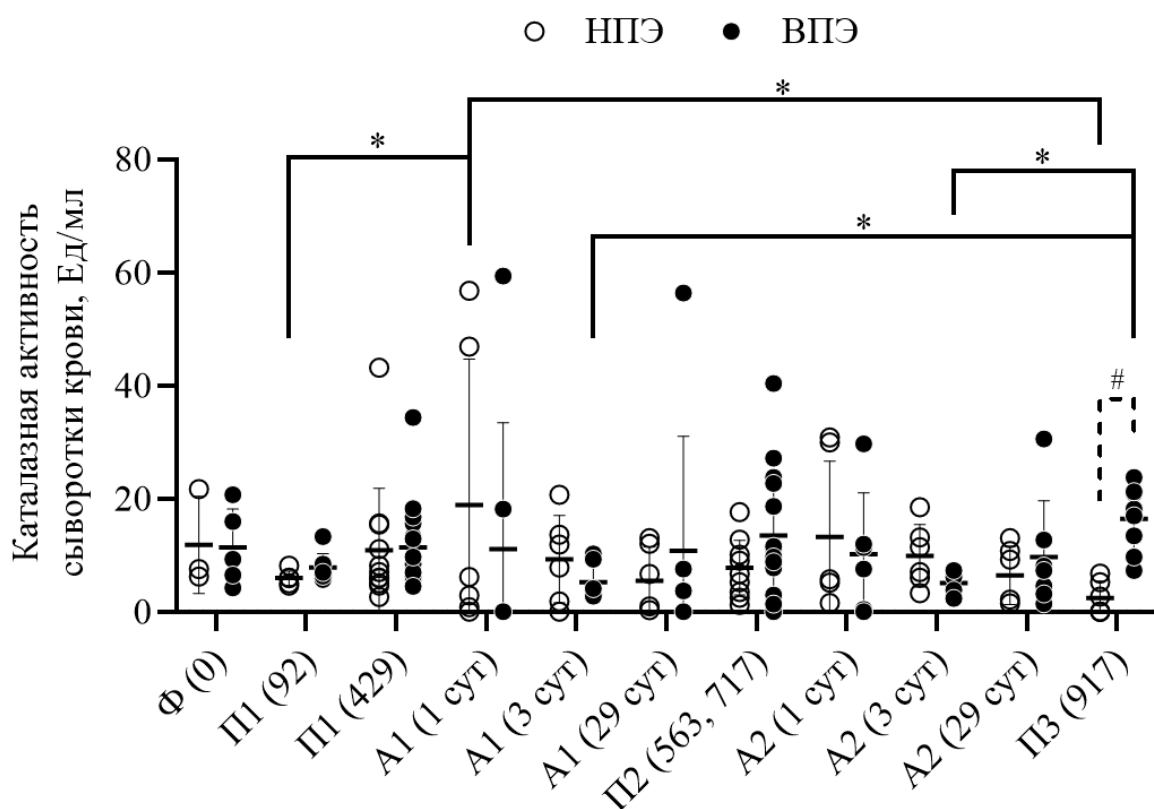


Рисунок 3.10 – Каталазная активность в сыворотке крови животных на разных сроках опыта. Ф – адаптационный период, П – период поддержания алкогольной мотивации, А – абстинентный период, арабской цифрой у литеры обозначен номер периода, в скобках указаны сутки опыта или периода лишения алкоголя. Данные 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

Межгрупповые различия между подгруппами НПЭ и ВПЭ были выявлены только в третьем периоде поддержания. На 917-е сутки каталазная активность в группе с высоким потреблением этанола (ВПЭ) была почти в восемь раз выше, чем в группе НПЭ. При этом, несмотря на резкое межгрупповое различие, уровень активности каталазы в ВПЭ не отличался достоверно от исходных значений внутри этой же группы, что может свидетельствовать о высокой индивидуальной вариабельности или адаптационных механизмах антиоксидантной системы.

На протяжении эксперимента в обеих группах наблюдалось устойчивое снижение уровня ТБК-реакционноспособных продуктов по сравнению со значениями, зарегистрированными в начале периода поддержания (92 сутки опыта), в котором наблюдалось увеличение их уровня по сравнению с фоновым значением (0 сутки). При этом статистически значимых различий между группами с низким и высоким потреблением этанола по данному показателю установлено не было (Рисунок 3.11).

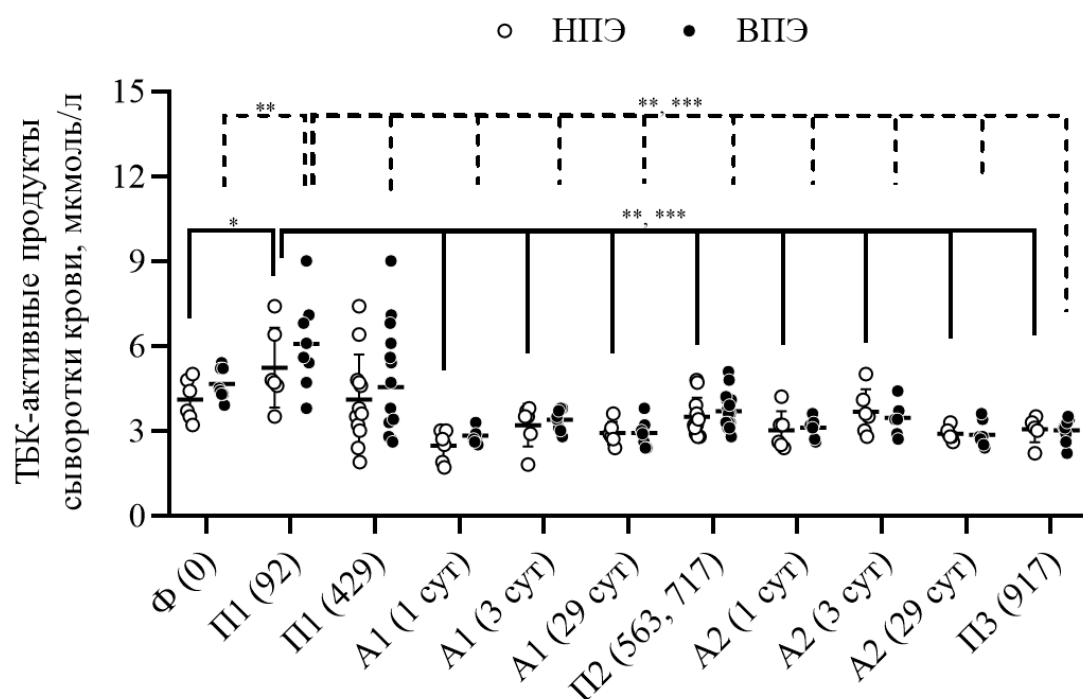


Рисунок 3.11 – Содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови на разных сроках опыта. Φ – адаптационный период, П – период поддержания алкогольной мотивации, А – абстинентный период, арабской цифрой у литеры обозначен номер периода, в скобках указаны сутки опыта или периода лишения алкоголя. Данные 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, *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$

3.5 Уровень кортизола и ДГЭА-С

У 36 животных определяли уровни кортизола и ДГЭА-С исходно и через 92 суток опыта (на рисунке 3.12). Анализ общей группы не выявил статистически значимых различий. Однако разделение животных на равночисленные квартили, отличающиеся уровнем потребления этанола за первые 55 суток этапа «Поддержание 1», показало, что по сравнению с 0-ми сутками в квартиле животных с максимальным уровнем потребления наблюдается статистически значимое снижение уровня кортизола ($p=0,003$). Регрессионный анализ и корреляционный анализ подтвердили наличие зависимости степени снижения кортизола от уровня потребления раствора этанола животными.

Для проверки независимости данного эффекта было проанализировано изменение уровня ДГЭА-С в те же сроки у 36 животных (на рисунке 3.13). Выявлено статистически значимое снижение уровня ДГЭА-С в общей группе на 92-е сутки опыта по сравнению с 0-ми сутками ($p=0,047$). Разделение животных на равночисленные квартили, отличающиеся уровнем потребления этанола за первые 55 суток этапа «Поддержание 1», показало, что уровень ДГЭА-С статистически значимо снижается во всех квартилях, кроме 2-го, с промежуточным уровнем потребления этанола. При этом регрессионный анализ и корреляционный анализ не выявили наличия зависимости степени снижения ДГЭА-С от уровня потребления раствора этанола животными.

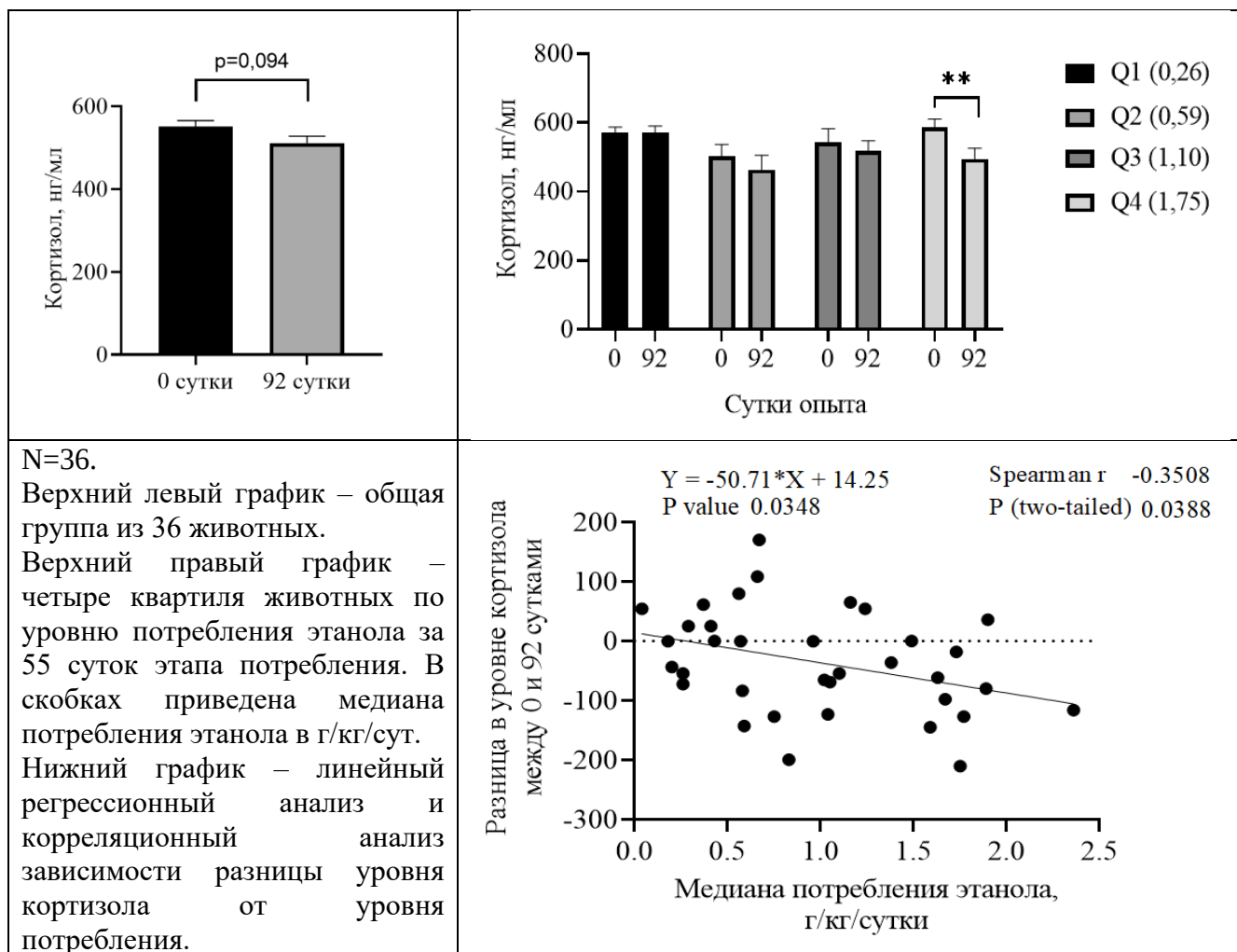


Рисунок 3.12 – Изменение уровня кортизола у 36 животных с 0 по 92 сутки опыта

Таким образом, установлено, что этанол оказал изолированное влияние на главный гормон гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси – кортизол. Данный результат является подтверждением описанного в литературе анксиолитического эффекта этанола [146]. Можно предположить, что именно он может являться определяющим в формировании алкогольной мотивации в условиях настоящего эксперимента. Изменение уровня ДГЭА-С не зависело от уровня потребления и отражает адаптационные процессы в условиях эксперимента.

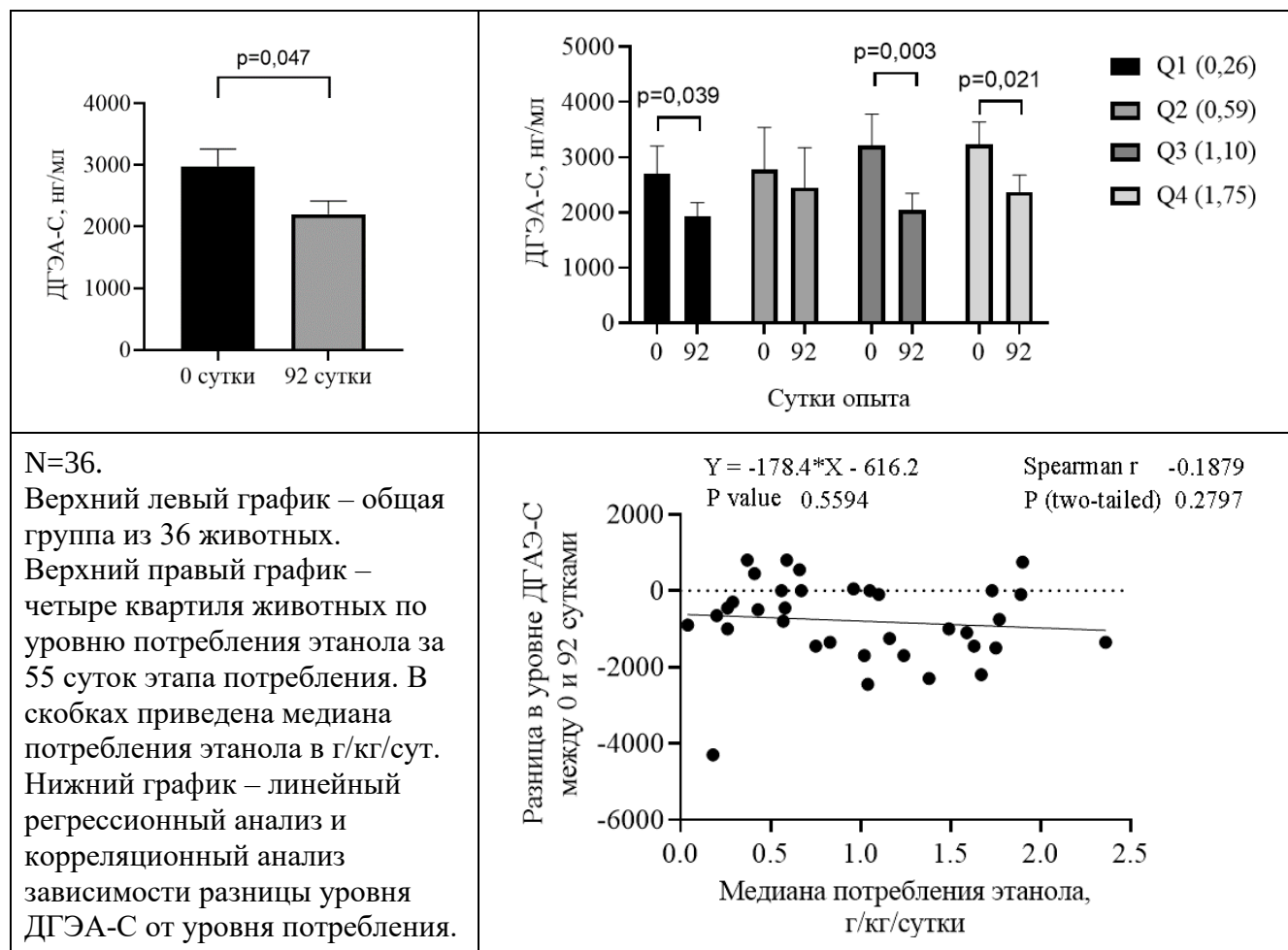


Рисунок 3.13 – Изменение уровня ДГЭА-С у 36 животных с 0 по 92 сутки опыта

Дальнейшее наблюдение за 14 животными, 6 из которых были отнесены к 1-му квартилю с наименьшими значениями потребления этанола (группа НПЭ) и 8 – к 4-му квартилю с наибольшим уровнем потребления (группа ВПЭ), показало, что уровень кортизола снижался в обеих группах до 717 суток, а на 917-е сутки вырос до значений фонового периода. Таким образом, можно предположить формирование толерантности к анксиолитическому действию этанола в условиях длительной экспозиции.

Таблица 3.4 – Биохимические параметры сыворотки крови животных двух исследованных групп ($M \pm m$)

Группа	Этап и сутки эксперимента					
	Фон	Поддержание				
	0	92	429	563	717	917
Кортизол, нг/мл						
НПЭ (n=6)	585±27	561±34	496±23 *	493±35	352±46 **	647±105
ВПЭ (n=8)	575±29	507±41	493±46 *	450±39 **	436±37 **	530±76
ДГЭА-С, нг/мл						
НПЭ (n=6)	2708±849	1633±320	1258±98 #	1988±606	1930±397	2277±325
ВПЭ (n=8)	3306±488	2619±458	3306±661	3042±1206	2325±380	2730±389
Данные получены совместно с Киргинцевым Р.М. *, ** – $p < 0,05$, $p < 0,01$ при сравнении с 0-ми сутками внутри группы, # – $p < 0,05$ при сравнении между группами						

3.6 Длина теломер

3.6.1 Оценка влияния хранения выделенной ДНК

При сравнении образцов ДНК после двухлетнего хранения и свежевыделенной ДНК от сопоставимых по полу, возрасту и условиям содержания животных в групповых вольерах статистически значимых различий в средней длине теломер не выявлено. Средняя длина теломер составила 16 т.п.о. в группе длительно хранившейся ДНК и 17 т.п.о. в группе свежевыделенной ДНК ($t(42) = 0,676$; $p = 0,503$).

Данные о средней относительной длине теломер у самцов макаков резусов в группах низкого и высокого потребления приведены в таблице 3.5. Результаты

измерения абсолютной средней длины теломер показаны на графике (Рисунок 3.14).

Индивидуальные траектории изменения абсолютной средней длины теломер представлены на рисунке 3.15. 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.

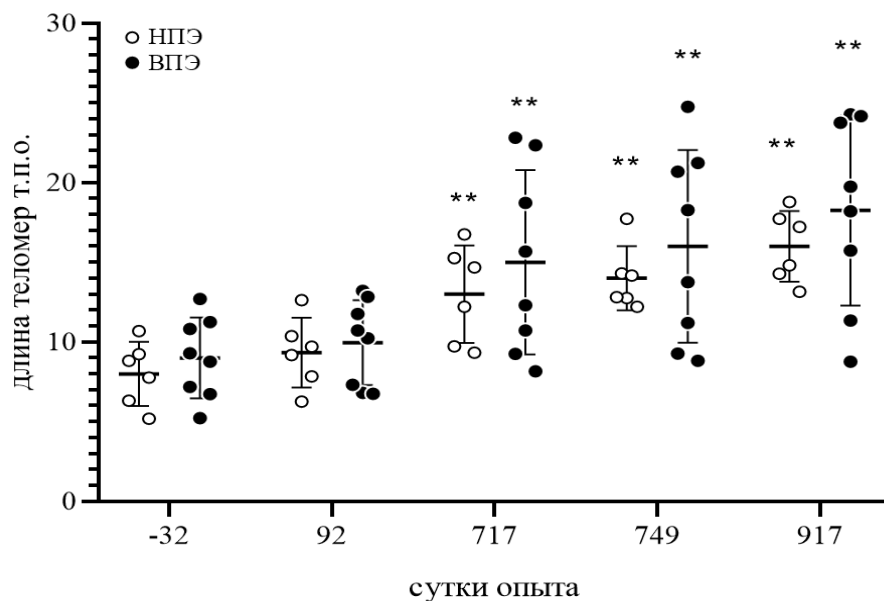


Рисунок 3.14 – Длина теломер лейкоцитов макак резусов в группах НПЭ и ВПЭ. Представлены индивидуальные значения и средние $\pm$ SD

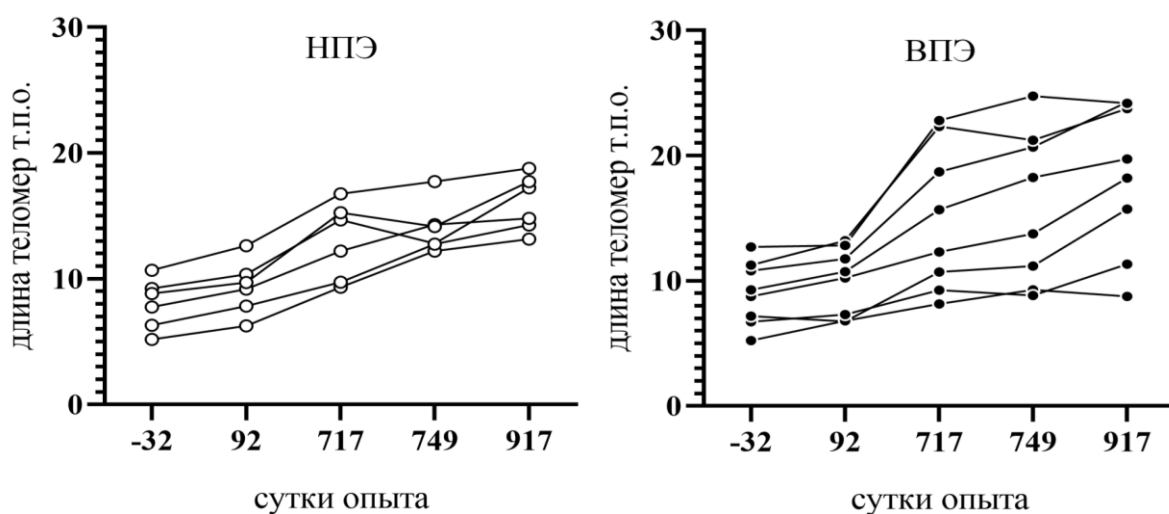


Рисунок 3.15 – Индивидуальная динамика абсолютной средней длины теломер лейкоцитов макак резусов в ходе эксперимента: а – группа низкого потребления этанола (НПЭ); б – группа высокого потребления этанола (ВПЭ)

Результаты нашего исследования не подтверждают ассоциацию умеренного потребления алкоголя с укорочением теломер, при достигнутых в использованной модели уровне и длительности экспозиции этанолом. К 92-м суткам абсолютная средняя длина теломер увеличилась в группе НПЭ с $8,0 \pm 0,8$ до $9,3 \pm 1,0$ т.п.о. ($p = 0,002$) (Таблица 3.6), 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 ($p = 0,067$). К 717-м и 917-м суткам увеличение длины теломер по сравнению с фоновыми значениями 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.

Таблица 3.5 – Относительная средняя длина теломер у макак резусов в группах низкого (НПЭ) и высокого (ВПЭ) потребления этанола на фоне, этапах поддержания алкогольной мотивации и в период лишения этанола ($M \pm m$)

Группа	Адаптация (фон)	Поддержание			Лишение алкоголя
	–32 сутки	92 сутки	717 сутки	917 сутки	749 сутки
					(29 суток лишения)
НПЭ (n=6)	$1,42 \pm 0,22$	$1,55 \pm 0,15$	$2,68 \pm 0,49$	$3,3 \pm 0,47$	$2,55 \pm 0,47$
ВПЭ (n=8)	$1,53 \pm 0,57$	$2,13 \pm 0,19$	$3,19 \pm 0,40$	$4,61 \pm 0,70$	$4,56 \pm 0,79$

Таблица 3.6 – Результаты попарного сравнения значений показателя абсолютной средней длины теломер у макак-резусов групп низкого и высокого потребления этанола в различные сроки эксперимента ($M \pm m$)

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±0,8	9,3±1	13,0±1,2	16,0±0,9	13,9±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±0,9	10,0±0,9	14,9±2	18,2±2,1	16,0±2,1
Значимость различий	–	$P_{1-2} = 0,0667$	$P_{1-3} = 0,0090$ $P_{2-3} = 0,0207$	$P_{1-4} = 0,0010$ $P_{2-4} = 0,0022$ $P_{3-4} = 0,0181$	$P_{1-5} = 0,0059$ $P_{2-5} = 0,0128$ $P_{3-5} = 0,2686$ $P_{4-5} = 0,0842$

Данные о средней длине теломер лейкоцитов макак резусов разного возраста приведены ниже (Таблица 3.7, рисунок 3.16). Нами не выявлено существенных различий в длине теломер лейкоцитов в разных возрастных группах. Следует отметить значительную индивидуальную вариабельность длины теломер. Она была сопоставимой в разных возрастных группах, что, несмотря на малую выборку, позволяет нам считать результаты нашего исследования достоверными.

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой зависимости длины теломер от возраста как у самцов, так и самок макак резусов (на рисунках 3.17–3.19).

Таблица 3.7 – Абсолютная средняя длина теломер лейкоцитов крови у макаков резусов разного возраста, тыс. пар оснований ($M \pm m$)

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		–	$P_{1-2}>0,999$	$P_{1-3}=0,525$ $P_{2-3}=0,529$	$P_{1-4}>0,999$ $P_{2-4}>0,999$ $P_{3-4}=0,525$	$P_{1-5}>0,999$ $P_{2-5}>0,999$ $P_{3-5}=0,979$ $P_{4-5}>0,999$	$P_{\text{самцы-самки}}=0,762$

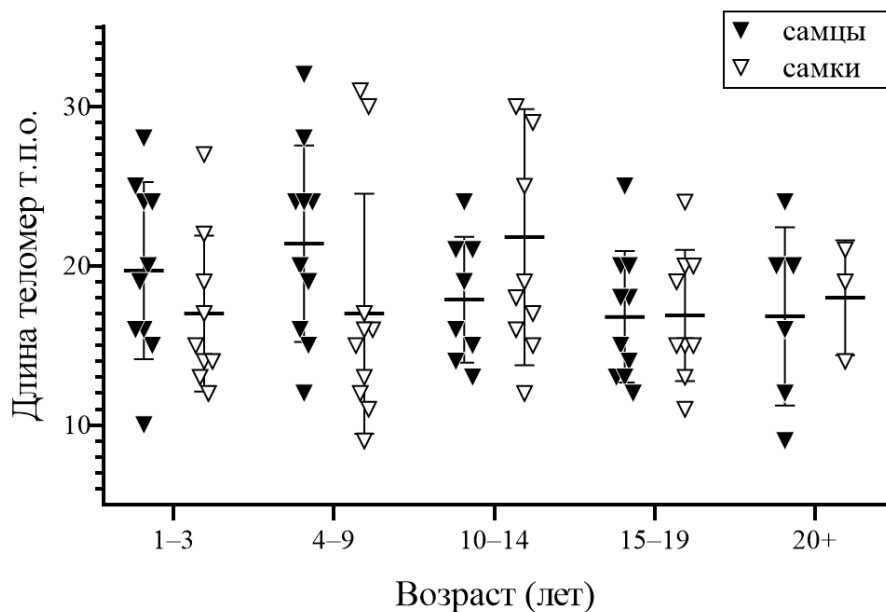


Рисунок 3.16 – Длина теломер лейкоцитов макаков резусов разных возрастных групп. Представлены индивидуальные значения и средние $\pm$ SD для самцов и самок. Двухфакторный дисперсионный анализ не выявил значимого влияния возраста ($p = 0,553$), пола ($p = 0,762$) или их взаимодействия ($p = 0,238$)

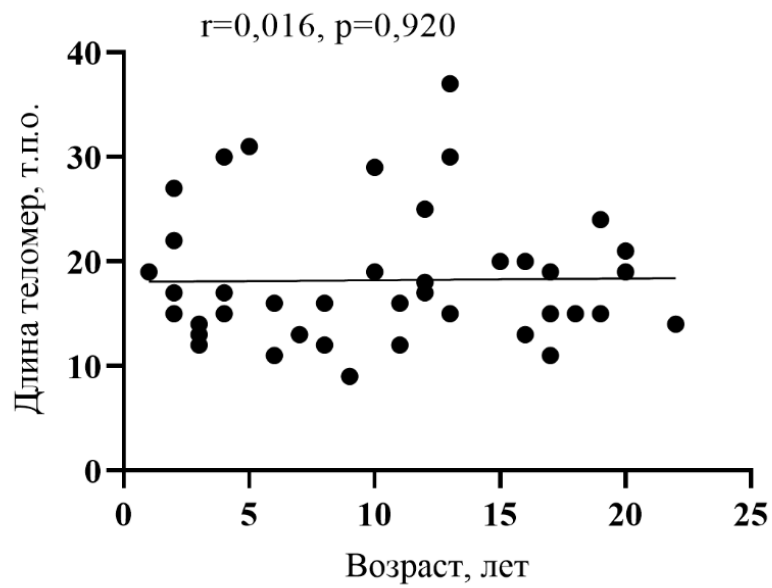


Рисунок 3.17 – Корреляция показателей «Возраст» и «Длина теломер» у интактных самок макак резус. Приведен коэффициент корреляции Пирсона

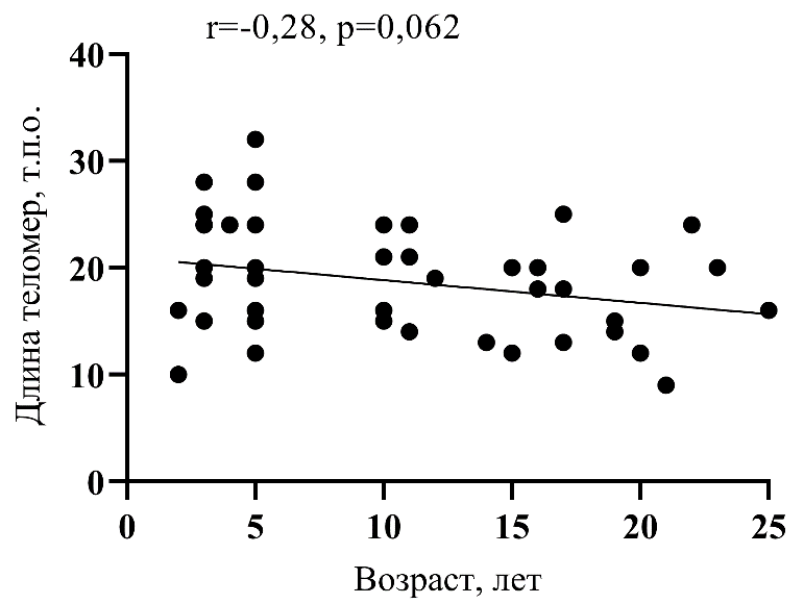


Рисунок 3.18 – Корреляция показателей «Возраст» и «Длина теломер» у интактных самцов макак резус. Приведен коэффициент корреляции Пирсона

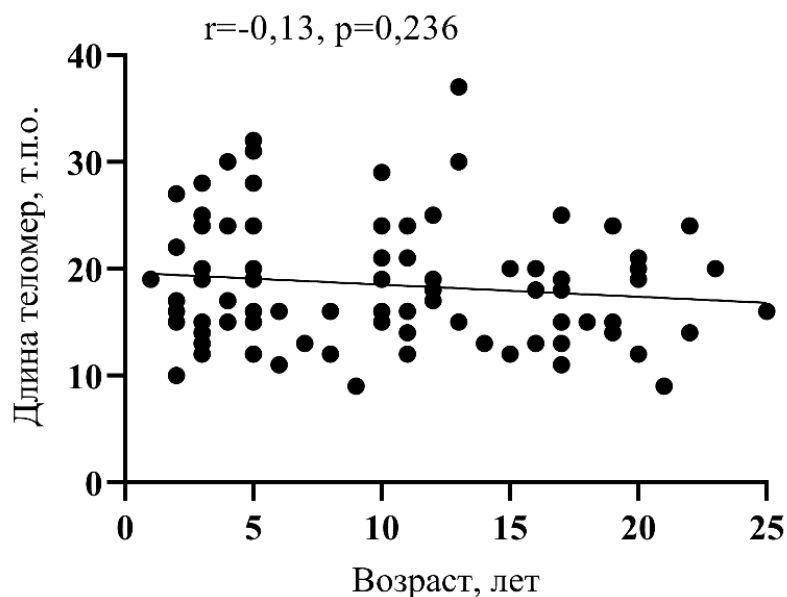


Рисунок 3.19 – Корреляция показателей «Возраст» и «Длина теломер» у интактных самок и самцов макак резус. Приведен коэффициент корреляции Пирсона

Перевод самцов яванских макак из группового содержания в условия индивидуальной изоляции сопровождался заметным уменьшением длины теломер лейкоцитов. При групповом содержании медианные значения длины теломер оставались относительно высокими, тогда как спустя 60 дней изоляции у большинства животных наблюдалось их выраженное укорочение (Рисунок 3.20). Индивидуальные изменения также подтвердили наблюдаемый эффект: у подавляющего большинства животных теломеры после периода изоляции были короче исходного уровня.

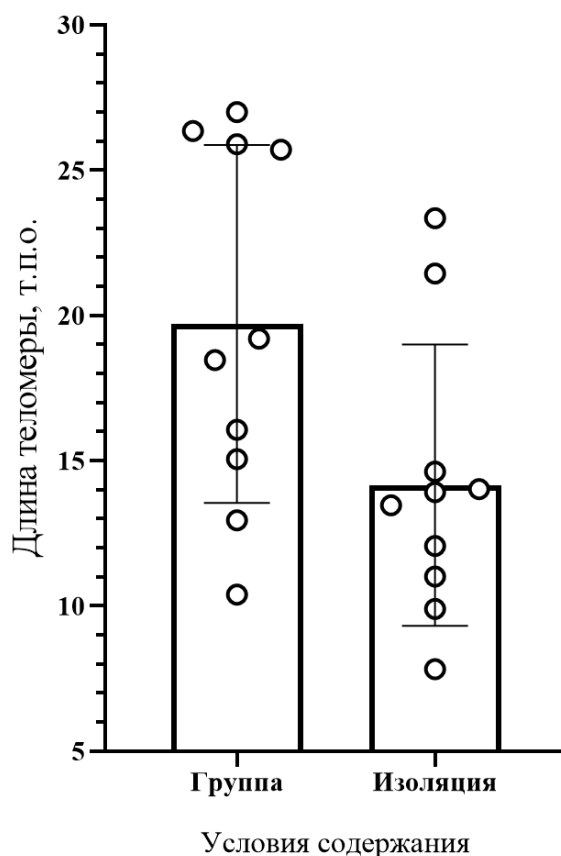


Рисунок 3.20 Длина теломер лейкоцитов у животных при групповом содержании и спустя 60 дней социальной изоляции ($t = 3,657$; $df = 9$; $p = 0,0053$)

Парный t -критерий подтвердил статистическую значимость эффекта ($t = 3,657$; $df = 9$; $p = 0,0053$), что указывает на систематическое влияние изолированных условий содержания на сокращение длины теломер. Средняя величина изменения составила $-5,5$ т.п.о. (95 % доверительный интервал от $-8,97$ до $-2,11$ т.п.о.). Коэффициент частичной эта $\eta^2 = 0,598$ свидетельствует о крупном эффекте вмешательства. Корреляция между значениями в паре составила $r = 0,643$ ($p = 0,045$, двусторонний критерий).

Таким образом, содержание в течение 60 дней в условиях изоляции приводит к статистически подтвержденному укорочению теломер лейкоцитов у животных, ранее содержавшихся в стабильных группах.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

4.1 Соматические и биохимические изменения при хроническом потреблении этанола

Использованная в настоящем исследовании модель со свободным выбором между 4 % раствором этанола и водой воспроизводит устойчивое добровольное потребление алкоголя у макак резусов. В ранее проведенных исследованиях показано, что индивидуальный уровень потребления этанола у макак сохраняется при изменении условий его предъявления и связан с выраженностью предпочтения раствора этанола по сравнению с водой [143]. При длительном свободном доступе к этанолу у животных также формируются устойчивые категории потребления, отражающие индивидуальные различия в алкогольной мотивации [144]. В нашем исследовании животные сохраняли различный уровень потребления этанола в течение продолжительного периода наблюдения, при этом количество потребляемого этанола коррелировало с его концентрацией в крови. Полученные результаты подтверждают устойчивость сформированной алкогольной мотивации и адекватность использованной модели для изучения последствий хронического воздействия этанола.

Дополнительным подтверждением биологической эффективности модели являются выявленные соматические и биохимические изменения. У животных группы ВПЭ к 722 суткам эксперимента наблюдалось снижение массы тела на 9 % по сравнению с исходным значением, тогда как в группе НПЭ значимых изменений данного показателя не выявлено. Одновременно с этим в группе ВПЭ начиная с 92 суток увеличивался уровень триглицеридов, а с 717 суток значения данного показателя превышали показатели группы НПЭ. Более раннее и выраженное изменение уровня триглицеридов у животных с высоким потреблением этанола свидетельствует о зависимости нарушений липидного обмена от уровня алкогольной нагрузки. При этом повышение триглицеридов

происходило на фоне снижения, а не увеличения массы тела, что не позволяет связать выявленное изменение с развитием избыточной массы тела животных.

Уровень общего холестерина снижался в обеих группах, однако в группе ВПЭ данные изменения наблюдались раньше, чем у животных с низким уровнем потребления этанола. Разнонаправленная динамика триглицеридов и общего холестерина указывает на комплексное нарушение липидного обмена при длительном воздействии этанола. Наиболее выраженный характер данных изменений в группе ВПЭ подтверждает, что они были связаны не только с продолжительностью эксперимента и условиями содержания животных, но и с уровнем потребления этанола.

Наряду с нарушениями липидного обмена, в группе ВПЭ с 717 суток наблюдалось увеличение активности гамма-глутамилтранспептидазы, а к 917 суткам было выявлено повышение содержания общего билирубина. Совокупность данных изменений свидетельствует о формировании холестатического синдрома при длительном потреблении этанола. В экспериментальной модели алкогольной болезни печени у макак резусов продолжительное потребление раствора этанола сопровождалось увеличением активности гамма-глутамилтранспептидазы и АСТ, а также развитием гистологических признаков стеатоза печени [141]. В нашем исследовании активность АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы существенно не изменялась, что указывает на отсутствие выраженного цитолитического повреждения печени и соответствует менее тяжелой степени алкоголь-индуцированных нарушений.

По данным ультразвукового исследования печени изменений эхогенности паренхимы и признаков жировой дистрофии не наблюдали. Эхокардиографическое исследование также не выявило нарушений морфологии и функции левого желудочка сердца на различных этапах эксперимента. Таким образом, сформировавшиеся метаболические и гепатобилиарные изменения не сопровождалось развитием выраженной структурной патологии печени и сердца. Отличия от моделей, в которых хроническое воздействие более высоких концентраций этанола приводило к стеатозу и повреждению печени [141], могут

быть обусловлены меньшей тяжестью алкогольной интоксикации в проведенном нами эксперименте.

Таким образом, совокупность полученных результатов подтверждает валидность использованной экспериментальной модели. Длительное добровольное потребление этанола сопровождалось формированием устойчивого индивидуального уровня потребления, повышением концентрации этанола в крови, изменением массы тела, нарушением липидного обмена и формированием холестатического синдрома. Следовательно, отсутствие укорочения теломер было установлено не при отсутствии биологического воздействия этанола, а на фоне начальных функциональных органных изменений. Используемая модель воспроизводит хроническое потребление этанола с развитием метаболических и функциональных гепатобилиарных нарушений, предшествующих формированию выраженной структурной патологии органов.

4.2 Влияние потребления этанола на длину теломер

В ходе эксперимента проведена оценка относительной и абсолютной средней длины теломер лейкоцитов периферической крови у самцов макаков резусов с различным уровнем добровольного потребления этанола. Медиана потребления в группе ВПЭ достигала 3,03 г/кг в сутки, а максимальная зарегистрированная концентрация этанола в крови составляла 160 мг/дл [142]. Достигнутый уровень экспозиции сопровождался соматическими, биохимическими и гематологическими изменениями, подтверждавшими системное действие этанола, но не приводил к уменьшению средней длины теломер.

К 917-м суткам эксперимента в обеих группах наблюдалось увеличение относительной и абсолютной средней длины теломер по сравнению с фоновым уровнем. В группе ВПЭ абсолютная средняя длина теломер увеличилась с $9,0 \pm 0,9$ до $18,2 \pm 2,1$ т.п.о., а в группе НПЭ – с $8,0 \pm 0,8$ до $16,0 \pm 0,9$ т.п.о.

Одним из возможных факторов, способных влиять на полученные значения, являлась различная продолжительность хранения образцов выделенной ДНК. Образцы, соответствовавшие начальным временным точкам эксперимента, хранились при отрицательной температуре дольше, чем образцы поздних сроков. Показано, что длительное хранение ДНК может снижать эффективность амплификации теломерной последовательности, тогда как амплификация референсных генов сохраняется более стабильной [147]. Теоретически это способно приводить к занижению относительных значений длины теломер в длительно хранившихся образцах. Однако при электрофоретической оценке признаков выраженной деградации выделенной ДНК нами не выявлено. Кроме того, дополнительное сравнение образцов ДНК большой группы животных после двухлетнего хранения со свежевыделенной ДНК животных, сопоставимых по полу, возрасту и условиям содержания, не указывает на деградацию теломерных последовательностей в хранящихся относительно длительное время образцах. Следовательно, длительное хранение выделенной ДНК не может рассматриваться как причина низких фоновых значений и их последующего увеличения.

Средняя длина теломер, определяемая в цельной крови, потенциально зависит от соотношения клеточных популяций, обладающих различной длиной теломер. В настоящем исследовании изменения основных компонентов лейкоцитарной формулы не соответствовали направлению и степени изменений длины теломер, что не позволяет объяснить полученный результат только перераспределением лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов. Вместе с тем хроническое воздействие этанола и периоды лишения способны изменять соотношение отдельных субпопуляций иммунных клеток, включая Т-клетки памяти [148]. Отдельное определение Т- и В-клеточных субпопуляций не проводилось, поэтому их вклад в среднюю длину теломер не может быть полностью исключен. Не исследовалась также длина теломер клеток-предшественников костного мозга. Наиболее вероятной причиной увеличения длины теломер клеток периферической крови, на наш взгляд, могло стать

обновление пула клеток-предшественников лейкоцитарного звена в условиях устранения или уменьшения действия некоего повреждающего фактора.

В эпидемиологических и клинических исследованиях представлены как данные об укорочении теломер при употреблении алкоголя [102], так и результаты, не подтверждающие наличие подобной ассоциации [114]. В исследовании Toriwała и соавт. был выявлен порог потребления до 17 стандартных доз алкоголя в неделю, ниже которого статистически значимое укорочение теломер не наблюдалось [93]. Однако прямое сопоставление потребления у человека и экспериментальных животных по числу стандартных доз ограничено межвидовыми различиями метаболизма этанола, характером распределения потребления во времени и достигаемой концентрацией этанола в крови.

Кроме того, исследования у людей не позволяют полностью отделить непосредственное действие этанола от влияния связанных с его употреблением факторов. Группы лиц с различным уровнем потребления алкоголя могут различаться по привычке к курению, по питанию, образу жизни, психосоциальной нагрузке, воспалительным и метаболическим нарушениям, заболеваниям печени и другим патологическим состояниям, каждое из которых способно влиять на длину теломер. Поэтому ассоциация употребления алкоголя с меньшей длиной теломер не всегда свидетельствует о самостоятельном этиологическом действии этанола.

Использованная экспериментальная модель позволила ограничить влияние значительной части подобных факторов за счет стандартизированных условий содержания и питания, непосредственной регистрации уровня потребления, определения концентрации этанола в крови и повторного исследования одних и тех же животных. Хроническая экспозиция сопровождалась нарушением липидного обмена, формированием биохимических признаков холестатического синдрома и изменениями клеточного состава крови, но не приводила к уменьшению средней длины теломер.

Одним из основных предполагаемых механизмов алкоголь-индуцированного повреждения теломер является окислительный стресс.

Метаболизм этанола способен сопровождаться образованием активных форм кислорода [94], а гуанин-содержащие теломерные последовательности 5'-TTAGGG-3' обладают повышенной чувствительностью к окислительному повреждению [58]. В культуре гепатоцитов человека воздействие этанола сопровождалось снижением экспрессии TERT и увеличением повреждений ДНК [32]. Вместе с тем в настоящем исследовании хроническое потребление этанола не приводило к развитию выраженного системного окислительного стресса по использованным показателям [142]. Отсутствие активации данного звена повреждения согласуется с отсутствием уменьшения длины теломер.

На изменения длины теломер могло также влиять функциональное состояние нейроэндокринных стресс-реализующих систем. Хронический психоэмоциональный стресс сопровождается активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и изменением секреции кортизола [149]. Длительное повышение концентрации глюкокортикоидов ассоциировано с нарушением функции митохондрий, изменением прооксидантно-антиоксидантного равновесия и накоплением повреждений ДНК [150]. Теломерные последовательности особенно уязвимы к подобному воздействию вследствие высокого содержания гуанина и ограниченной эффективности репарации повреждений в терминальных участках хромосом [146].

В нашем исследовании ранее было показано изменение концентрации кортизола у макаков резусов, добровольно потреблявших раствор этанола [151]. При анализе данных 36 животных выявлена статистически значимая отрицательная связь между уровнем потребления этанола и изменением концентрации кортизола с 0-х по 92-е сутки эксперимента. Более высокий уровень потребления ассоциировался с более выраженным снижением концентрации кортизола. Значимость зависимости была подтверждена линейным регрессионным анализом ($p=0,0348$) и ранговым корреляционным анализом Спирмена ($r=-0,3508$; $p=0,0388$). Изменение концентрации ДГЭА-С за тот же период не зависело от количества потребляемого этанола.

При дальнейшем наблюдении концентрация кортизола снижалась в обеих группах вплоть до 717-х суток, а к 917-м суткам возвращалась к значениям, статистически не отличавшимся от фонового уровня. Такая динамика соответствует перестройке гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в условиях длительного эксперимента и формированию адаптации к повторяющемуся воздействию. Длительная динамика ДГЭА-С не демонстрировала устойчивой зависимости от уровня потребления этанола: межгрупповое различие выявлялось только на 429-е сутки и не сохранялось на последующих этапах. Интересной представляется динамика концентрации ТБК-реактивных продуктов. На 92-е сутки эксперимента отмечалось ее повышение, тогда как к 429-м суткам показатель существенно снижался. Такая динамика может отражать кратковременное усиление процессов перекисного окисления липидов в начальный период воздействия этанола с последующей адаптацией системы антиоксидантной защиты.

Полученные результаты согласуются с данными о способности этанола модулировать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [146,152]. При кратковременном воздействии его нейробиологические эффекты могут быть связаны с усилением ГАМК-ергической нейротрансмиссии и изменением нейроэндокринного ответа на стресс [153]. Вместе с тем снижение концентрации кортизола является косвенным показателем и не позволяет однозначно судить об уменьшении психоэмоционального стресса. Прямая связь между индивидуальными изменениями кортизола, показателями окислительного стресса и длиной теломер в настоящем исследовании не оценивалась. Поэтому перестройка нейроэндокринного ответа может рассматриваться только как один из факторов, сопровождавших адаптацию животных, но не как установленный механизм увеличения или предотвращения укорочения длины теломер.

Характер воздействия этанола на теломеры зависит от интенсивности и продолжительности экспозиции, степени развития метаболических и воспалительных нарушений и состояния защитных систем организма. При высокодозной хронической интоксикации истощение адаптационно-

компенсаторных механизмов сопровождается развитием клеточного повреждения [154]. В использованной модели нарушения липидного обмена, биохимические признаки, свидетельствующие о холестатическом синдроме, изменения клеточного состава крови и нейроэндокринной регуляции возникали при отсутствии устойчивого повышения исследованных показателей окислительного повреждения и уменьшения средней длины теломер лейкоцитов. Это указывает на одновременное формирование различных звеньев патологического процесса при хроническом воздействии этанола.

Таким образом, хроническое потребление этанола продолжительностью до 917 суток не сопровождалось уменьшением средней длины теломер лейкоцитов. Полученный результат не следует интерпретировать как свидетельство защитного или удлиняющего теломеры действия этанола. Увеличение показателя относительно фонового уровня требует учета исходного состояния животных и влияния перевода на индивидуальное содержание, что подробно рассмотрено в разделе 4.7. В исследованном диапазоне экспозиции этанол не являлся достаточным самостоятельным этиологическим фактором укорочения теломер, тогда как сопутствующие метаболические, воспалительные и психосоциальные воздействия могут определять реализацию данного повреждения при других условиях.

4.3 Лейкоцитарный профиль и влияние алкоголя на состав крови

Общее количество лейкоцитов на протяжении эксперимента оставалось стабильным. Наблюдавшиеся на начальных этапах межгрупповые различия относительного содержания лимфоцитов и нейтрофилов к завершению эксперимента нивелировались. Вместе с тем к 917-м суткам у животных обеих групп было выявлено почти двукратное увеличение относительного содержания моноцитов по сравнению с исходным уровнем (Рисунок 3.7), что может свидетельствовать о формировании провоспалительного профиля крови. При этом

динамика основных популяций лейкоцитов не соответствовала динамике длины теломер: увеличение относительной и абсолютной средней длины теломер наблюдалось на фоне разнонаправленных изменений лейкоцитарной формулы и отсутствия изменений общего количества лейкоцитов. Следовательно, выявленное увеличение средней длины теломер не может быть объяснено только изменением количественного состава основных популяций клеток периферической крови.

Выявленные изменения происходили при отсутствии выраженной структурной патологии печени и сердца по данным ультразвукового исследования и могут отражать более ранний этап системных нарушений.

Известно, что у макак резус для развития изменений в миокарде по типу жировой дистрофии и фиброза требуется потребление этанола в количестве 40 % общей калорийности пищи на протяжении нескольких месяцев, а для развития выраженной алкогольной болезни печени – потребление на протяжении трех лет в среднем 9,6 г/кг/сутки или 24 % общей калорийности пищи [155].

Таким образом, отсутствие структурных изменений по данным ультразвукового исследования не противоречит наличию выявленных биохимических и гематологических изменений, а может быть связано с меньшей тяжестью алкогольной нагрузки в использованной модели.

Выявленные изменения лейкоцитарного профиля могут рассматриваться как одно из проявлений системного биологического действия хронического потребления этанола, не сопровождавшегося выраженным изменением общего количества клеток крови. При этом полученные нами данные сами по себе не позволяют определить пороговый уровень потребления, при котором начинают формироваться неблагоприятные последствия. Однако они согласуются с результатами эпидемиологических исследований, указывающих на возможность развития изменений нервной системы при умеренном потреблении алкоголя [93], а также на дозозависимое увеличение риска опухолей полости рта и глотки [156]. Одним из механизмов канцерогенного действия этанола является образование ацетальдегидом аддуктов с ДНК, способствующих развитию генотоксических

повреждений [157]. Таким образом, отсутствие выраженной органной патологии не исключает формирования более ранних функциональных, метаболических и клеточных изменений.

В группе ВПЭ на третьи сутки как первого, так и второго периода лишения этанола наблюдалось снижение количества эритроцитов периферической крови (Рисунок 3.9). Во втором периоде лишения также было выявлено снижение гематокрита до $44,2 \pm 1,0$ %, статистически значимое по сравнению как с исходным уровнем в группе ВПЭ, так и со значением группы НПЭ на тот же срок. Вместе с тем данный показатель оставался в пределах физиологических значений, установленных для макак резусов [158], а на других этапах эксперимента устойчивых изменений эритроцитарных показателей не наблюдали. Одним из возможных объяснений снижения количества эритроцитов и гематокрита является увеличение потребления жидкости в период лишения этанола, способное приводить к относительной гемодилюции. В литературе описано, что в период лишения алкоголя наблюдается повышение потребления жидкости, что указывает на возможность реализации подобного механизма и в нашем эксперименте [159]. Клинические признаки абстинентного синдрома в периоды лишения этанола у животных отсутствовали. Следовательно, выявленные изменения имели транзиторный характер и не сопровождались развитием выраженного синдрома отмены.

Одним из возможных объяснений одновременного снижения количества эритроцитов и гематокрита является изменение водного баланса и развитие относительной гемодилюции. Этанол обладает диуретическим действием, выраженность которого зависит от количества и концентрации употребляемого алкогольного напитка [160]. После прекращения его потребления изменение объема потребляемой жидкости и восстановление водного баланса могли приводить к временному снижению концентрационных показателей крови. Однако объем потребления воды в периоды лишения этанола в настоящем исследовании не определяли, поэтому данный механизм не может считаться установленным.

В экспериментальных исследованиях на макаках резусах показано, что повторные периоды лишения способны влиять на последующее самопотребление этанола [159]. Однако в настоящей работе поведенческие проявления, направленные на поиск этанола, количественно не оценивали, а клинические признаки абстинентного синдрома отсутствовали. В связи с этим выявленные гематологические изменения не могут рассматриваться как самостоятельное доказательство формирования физической зависимости или компульсивного поведения.

Хроническое воздействие этанола также способно влиять на клеточные процессы в костном мозге, включая дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток [161]. Вместе с тем в периоды потребления этанола нами не выявлено устойчивого снижения количества эритроцитов, общего количества лейкоцитов или других признаков угнетения костномозгового кроветворения. Кроме того, в периоды лишения наблюдалось снижение, а не увеличение количества эритроцитов. Поэтому объяснение выявленных изменений восстановлением кроветворения после прекращения воздействия этанола не соответствует полученным результатам.

Таким образом, хроническое потребление этанола сопровождалось обратимыми изменениями лейкоцитарного профиля с увеличением относительного содержания моноцитов, а периоды лишения этанола – транзиторным снижением эритроцитарных показателей у животных группы ВПЭ. Выявленные изменения подтверждают наличие системного биологического действия этанола в использованной модели, однако не сопровождалось выраженным нарушением кроветворения или клиническими проявлениями абстинентного синдрома. Отсутствие соответствия между динамикой основных популяций лейкоцитов и длиной теломер также указывает на то, что изменение клеточного состава периферической крови не являлось причиной наблюдавшегося увеличения средней длины теломер.

4.4 Влияние возраста на длину теломер

Поскольку наше исследование у макак резусов, потреблявших алкоголь, длилось несколько лет, было важно проанализировать влияние возраста на длину теломер у этих животных. Кроме того, у больных алкогольной зависимостью показано резкое укорочение относительной длины теломер с возрастом по сравнению со здоровыми донорами при отсутствии статистически значимых различий в относительной длине теломер между группой больных алкогольной зависимостью и контрольной группой [162]. В изученной нами выборке макак резусов разного пола и возраста выявлена значительная индивидуальная вариабельность длины теломер, что соответствует данным литературы [134]. Согласно двухфакторному дисперсионному анализу статистически значимых различий между группами не установлено ($p = 0,553$), что согласуется с высокой внутригрупповой вариабельностью и отсутствием выраженного тренда на уровне средней длины теломер.

Полученные значения длины теломер у интактных макак резусов варьировали от 9 до 37 т.п.о. на одну теломеру; медиана по выборке составила около 17,1 т.п.о. Опубликованные значения существенно различаются в зависимости от метода и исследованного материала. Так, при абсолютной qPCR в ДНК цельной крови 11 взрослых самок макак резусов получен диапазон 12,3–17,1 т.п.о. при среднем значении 14,4 т.п.о. [163], тогда как при TRF-анализе тканей яванских макак средние значения для разных тканей составляли 15,4–17,5 т.п.о. [20]. В более раннем межвидовом TRF-исследовании для различных тканей макак сообщались значения не менее 23 т.п.о. [164]. В исследовании 71 макаки резуса методом TRF была показана выраженная межиндивидуальная вариабельность длины теломер в лейкоцитах, коже, скелетной мышце и жировой ткани. Прямая связь средней длины теломер с возрастом внутри отдельных тканей не достигала статистической значимости, однако при использовании длины теломер мышечной ткани как индивидуального референтного показателя выявлено возрастзависимое укорочение теломер лейкоцитов и кожи [165]. Таким образом, полученный нами

диапазон частично перекрывается с опубликованными данными, а расхождения могут быть обусловлены методом измерения, составом клеток, исследованной тканью, возрастом и условиями содержания животных.

У большинства животных теломеры укорачиваются с возрастом, что связано с клеточным делением и уменьшением длины теломерных последовательностей [166–168]. Однако у некоторых видов, таких как магеллановы пингвины, длина теломер остается стабильной на протяжении жизни [169]. Подобные наблюдения сделаны и для летучих мышей вида *Myotis myotis*, у которых теломеры не укорачиваются с возрастом, что может способствовать их долголетию [170]. Еще одно исследование показало, что у людей старше 64 лет после курса гипербарической оксигенотерапии наблюдалось увеличение длины теломер иммунных клеток более чем на 20 % ($p < 0,05$) [171]. Хотя механизмы этого явления до конца не изучены, предполагается, что определенные условия могут способствовать активации теломеразы или других защитных механизмов. Эти открытия подчеркивают возможность существования механизмов, не только предотвращающих укорочение теломер, но и способствующих их увеличению, и, следовательно, замедляющих процессы клеточного старения.

Также в сравнительном исследовании [57] показано, что скорость укорочения теломер, а не их начальная длина, является надежным прогностическим показателем продолжительности жизни у позвоночных. Авторы измерили скорость укорочения теломер у нескольких видов млекопитающих и птиц и предположили, что скорость укорочения теломер (telomere shortening rate, TSR) лучше отражает видоспецифическую продолжительность жизни, чем абсолютная длина теломер. Возможно, наши данные связаны с различиями в продолжительности жизни животных с короткими и длинными теломерами. Поперечный дизайн исследования не позволяет судить об этом.

В контексте лабораторных приматов исследования возрастной динамики длины теломер остаются немногочисленными. В работе с применением абсолютной qPCR по O'Callaghan и Fenech у макаков резусов исследовали только 11 взрослых самок в узком возрастном диапазоне 7–10 лет, а основной задачей было

сравнение условий раннего содержания, а не возрастных изменений [163]. В более крупном исследовании 71 макаки резуса применяли TRF-анализ нескольких тканей и оценивали влияние возраста, пола и ограничения калорийности рациона [165]. Сочетание обоих полов, широкого возрастного диапазона от 1 до 24 лет и определения абсолютной длины теломер лейкоцитов отличает настоящее исследование от этих работ и дополняет имеющиеся данные о теломерной биологии макак резусов.

Таким образом, можно предположить, что у макак резусов укорочение теломер происходит в более позднем возрасте или под воздействием специфических факторов окружающей среды. Дальнейшие исследования, включающие продольные наблюдения, более широкий возрастной диапазон и учет различных условий содержания, необходимы для более глубокого понимания возрастной динамики теломер у этого вида приматов.

4.5 Методические аспекты вариабельности определения длины теломер

В рамках нашего исследования для оценки длины теломер применялся метод количественной полимеразной цепной реакции (qPCR), характеризующийся воспроизводимостью и пригодностью для клинических исследований (O'Callaghan и Fenech, 2011) [134].

Однако использованная методика измерения длины теломер характеризуется значительной вариабельностью между лабораториями. Данный метод чувствителен к качеству ДНК, точности приготовления стандартов, калибровке оборудования и особенностям праймерного дизайна. Как и при использовании других qPCR-подходов, при qPCR для измерения абсолютной длины теломер может наблюдаться межплатформенная и межлабораторная вариабельность, особенно при работе с биоматериалом, отличающимся по клеточному составу, как это происходит с лейкоцитами.

qPCR позволяет проводить исследования на небольшом количестве ДНК, но отличается низкой межлабораторной воспроизводимостью и вариабельностью результатов, особенно при определении коротких теломер [172]. Для повышения воспроизводимости и сопоставимости результатов необходимо внедрение стандартизированных методик измерения длины теломер, что позволит минимизировать межлабораторную вариабельность. Сравнение результатов, полученных методом абсолютной qPCR, с данными, основанными на TRF или FISH, требует осторожности, так как методы различаются по чувствительности, разрешающей способности и способу оценки длины теломер. Например, TRF может завышать длину за счет захвата субтеломерных последовательностей [173], а qPCR не позволяет различить распределение длины индивидуальных теломер, но отражает усредненное значение.

Также важно учитывать отличия в длине теломер между разными клетками и тканями организма. Мы использовали для исследования длины теломер лейкоциты по ряду причин. Лейкоциты являются наиболее широко используемыми клетками для измерения длины теломер в исследованиях старения, заболеваний и воздействия различных факторов на организм. Длина теломер лейкоцитов периферической крови коррелирует с длиной теломер клеток внутренних органов человека, отражает их функциональное состояние, уменьшается под воздействием повреждающих факторов и может использоваться в качестве интегрального показателя состояния здоровья [174]. Их выбор обусловлен, прежде всего, доступностью и малой инвазивностью. Забор крови представляет собой относительно простой метод получения биоматериала, что делает его удобным для исследований на больших выборках [175]. Кроме того, лейкоциты циркулируют в крови и взаимодействуют с различными тканями, поэтому длина теломер в них может отражать системный уровень клеточного старения и другие изменения (процессы) на уровне организма, такие как воспаление, стресс и метаболические нарушения [44]. Это особенно важно учитывать в эпидемиологических исследованиях, поскольку укорочение теломер ассоциируется с возрастом и повышенным риском развития различных

заболеваний, включая сердечно-сосудистые патологии, диабет и онкологические заболевания [176].

Кроме того, лейкоциты относительно гомогенны по сравнению с тканями, которые состоят из множества типов клеток (фибробласты, эпителиоциты, миоциты, эндотелиоциты и др.) с разными темпами пролиферации и степенью экспрессии теломеразы. Однако, несмотря на эти преимущества, использование лейкоцитов для анализа длины теломер имеет и значительные ограничения. Одним из недостатков является гетерогенность популяции лейкоцитов: они включают различные подтипы, такие как нейтрофилы, лимфоциты и моноциты, которые обладают разной степенью конечной дифференцировки (сегментация ядра у гранулоцитов), скоростью деления предшественников и уровнем теломеразной активности. Например, лимфоциты делятся чаще, чем нейтрофилы, что может приводить к вариабельности результатов [177]. Воспалительные процессы и инфекции также могут влиять на длину теломер, изменяя соотношение различных подтипов лейкоцитов и ускоряя процесс укорочения теломер из-за повышенной активации и пролиферации иммунных клеток [178]. Как частный пример – у приматов мышечная ткань часто имеет более длинные теломеры, чем лейкоциты [85]. Поэтому при сравнении между видами, при прочих равных, предпочтение отдается данным по лейкоцитам (клеткам крови) как наиболее часто исследуемому типу клеток (Таблица 4.1). Однако значения, полученные различными методами и в разных типах клеток или тканей, не являются непосредственно сопоставимыми. TRF включает теломерную и часть субтеломерной ДНК, а qPCR, Q-FISH и Flow-FISH основаны на разных принципах измерения и калибровки.

Результаты исследований клеточных культур дополнительно показывают, почему данные *in vitro* нельзя непосредственно сопоставлять с длиной теломер клеток крови. Shimizu с соавторами исследовали 35 культур адгезивных клеток кожи, почек и легких, полученных от 23 макаков в возрасте от эмбрионального периода до 22 лет. Культуры различались по репликативной продолжительности жизни и признакам клеточного старения; теломеразная активность отсутствовала

во всех линиях, кроме трансформированной [179]. Steinert с соавторами показали на фибробластах кожи приматов, включая макаку резуса, что средняя длина теломер у исследованных видов варьировала от 4 до 16 т.п.о., а укорочение теломер ограничивало репликативный потенциал клеток [180]. Эти данные важны для понимания клеточных механизмов старения, но не являются прямым референтным диапазоном для лейкоцитов периферической крови.

Таблица 4.1 – Сравнительная характеристика абсолютной длины теломер у человека и отдельных видов млекопитающих с учетом метода измерения и биологического материала

Вид	Метод	Биологический материал	Длина теломер, т.п.о.	Характеристика выборки	Источник
Человек	TRF (Southern blot)	лейкоциты крови новорожденных	7,01–11,6; среднее $9,50 \pm 0,70$	новорожденные обоих полов	[181]
Человек	TRF (Southern blot)	лейкоциты периферической крови	4,45 у мужчин; 4,63 у женщин	548 близнецов обоих полов; 73–94 года	[182]
Макака резус	абс. qPCR	лейкоциты периферической крови	9–37; медиана $\approx 17,1$	41 самка и 44 самца; 1–24 года	Наша работа
Макака резус	абс. qPCR	ДНК цельной крови	12,3–17,1; среднее 14,4	11 самок; 7–10 лет	[163]
Макаки: <i>M. mulatta</i> , <i>M. fuscata</i> , <i>M. fascicularis</i>	TRF (Southern blot)	различные соматические ткани	≥ 23	пол и возраст в публикации не указаны	[164]
Яванский макак	Flow-FISH	моноклеарные клетки периферической крови (PBMC)	$14,2 \pm 1,2$	55 животных; 0–34 года	[183]
Яванский макак	TRF (Southern blot)	кожа, скелетная мышца, внутренние органы и гонады	15,4–17,5 (средние значения для тканей)	23 животных обоих полов; 3,6–23 года	[20]
Антропоидные приматы, включая макаку резуса	TRF (Southern blot)	фибробласты кожи (in vitro)	4–16 (диапазон средних значений у исследованных видов)	культуры клеток нескольких видов приматов	[180]

Продолжение таблицы 4.1

Вид	Метод	Биологический материал	Длина теломер, т.п.о.	Характеристика выборки	Источник
Лабораторные мыши нескольких инбредных линий	Q-FISH	клетки костного мозга и фибробласты кожи	5–60; отдельные теломеры до 80	несколько инбредных линий	[56]
Собака (разные породы)	абс. qPCR	моноклеарные клетки периферической крови (PBMC)	11,4–27,9 (средние значения для пород)	175 собак; 26 пород	[184]

Другим важным ограничением является то, что длина теломер в лейкоцитах не всегда отражает процессы, происходящие в других тканях. В разных органах теломеры укорачиваются с разной скоростью, и показатели, полученные в крови, могут не коррелировать с динамикой укорочения теломер, например, в печени, эндотелии или нервной ткани [185]. Кроме того, измерение длины теломер может зависеть от используемого метода: qPCR, FISH и TRF (Southern blot) могут давать различающиеся результаты, что требует стандартизации и осторожности при интерпретации данных [173].

4.6 Окислительный стресс и хроническое потребление этанола

Проведенный нами анализ показателей перекисного окисления липидов выявил увеличение содержания ТБК-активных продуктов на 92-е сутки эксперимента по сравнению с фоновым значением. В дальнейшем в обеих группах наблюдалось устойчивое снижение данного показателя, при этом статистически значимых различий между группами НПЭ и ВПЭ установлено не было. Таким образом, первоначальное повышение уровня ТБК-активных продуктов имело транзиторный характер, а длительное потребление этанола в количествах, приводивших к его содержанию в крови до 160 мг/дл, не

сопровождалось нарастающей активацией процессов перекисного окисления липидов.

Значимых изменений каталазной активности относительно фоновых значений внутри исследуемых групп также не выявлено. Вместе с тем на 917-е сутки активность каталазы в группе ВПЭ была почти в восемь раз выше, чем в группе НПЭ. Данное межгрупповое различие указывает на неодинаковое состояние ферментативного звена антиоксидантной системы животных на позднем этапе эксперимента, однако отсутствие значимых изменений относительно фона не позволяет рассматривать его как свидетельство устойчивой активации антиоксидантной защиты. В совокупности динамика ТБК-активных продуктов и каталазной активности свидетельствует о том, что хроническое потребление этанола при достигнутом уровне воздействия не приводило к развитию выраженного системного окислительного стресса.

При этом исследованные показатели характеризуют отдельные звенья прооксидантно-антиоксидантной системы. Отсутствие устойчивого повышения содержания продуктов перекисного окисления липидов не исключает возможности окислительного повреждения других классов биомолекул. В частности, окислительная модификация белков способна нарушать функции ферментов и структурных компонентов клетки, а повреждение нуклеиновых кислот может способствовать накоплению мутаций и развитию геномной нестабильности [186].

Наряду с окислительными механизмами, длительное воздействие этанола может реализовываться посредством токсического действия ацетальдегида. Ацетальдегид способен образовывать аддукты с белками, нарушая их структуру и функции, а также взаимодействовать с ДНК, вызывая генотоксические повреждения и повышая вероятность возникновения мутаций [156,187]. Следовательно, отсутствие выраженных изменений исследованных показателей окислительного стресса не свидетельствует об отсутствии других молекулярных механизмов повреждающего действия этанола.

В целом полученные нами данные показывают, что хроническое потребление этанола макаками резусами в количествах, эквивалентных 35–42 стандартным дозам в неделю у человека, при его содержании в крови до 160 мг/дл не сопровождалось формированием выраженного системного окислительного стресса по исследованным показателям. Отсутствие устойчивой активации перекисного окисления липидов согласуется с отсутствием укорочения теломер в ходе эксперимента и указывает на то, что при достигнутом уровне воздействия не сформировался один из основных механизмов их ускоренного повреждения.

4.7 Влияние условий содержания экспериментальных животных на изменения длины теломер

После завершения основного этапа исследования было проведено дополнительное исследование, целью которого являлась оценка влияния перевода животных из обычных условий группового содержания в условия индивидуального содержания, соответствующие условиям основного эксперимента с хроническим потреблением этанола. Необходимость его проведения была обусловлена особенностями дизайна основного эксперимента, в котором первый забор крови осуществляли в фоновом адаптационном периоде, когда животные уже были переведены из социальных групп в индивидуальные клетки. Таким образом, исходные значения длины теломер отражали состояние животных уже после изменения условий содержания. Данные до перевода на индивидуальное содержание в основном эксперименте отсутствовали.

В дополнительном эксперименте был воспроизведен аналогичный переход: животных переводили из стабильных социальных групп в индивидуальные клетки без контакта с ранее знакомыми особями и содержали в условиях, соответствующих условиям основного эксперимента. Через 60 суток наблюдалось статистически значимое уменьшение средней длины теломер лейкоцитов на 5,5 т.п.о. (95 % ДИ от –8,97 до –2,11 т.п.о.; $\eta^2=0,598$). Достигнутые значения были

сопоставимы с исходным уровнем длины теломер в эксперименте с хроническим потреблением этанола. Полученные результаты позволяют рассматривать изменение условий содержания как один из факторов, определивших относительно низкие исходные значения показателя в основном эксперименте.

В дальнейшем в обеих группах основного эксперимента с потреблением этанола наблюдалось постепенное увеличение абсолютной средней длины теломер. К 917-м суткам значения у всех животных превышали исходный уровень и соответствовали диапазону, выявленному у интактных макак резусов, содержащихся в социальных группах. Такая динамика может отражать адаптацию животных к условиям индивидуального содержания и восстановление показателя после его первоначального снижения. Поэтому последующее увеличение средней длины теломер нельзя однозначно интерпретировать как непосредственный эффект этанола.

Результаты дополнительного эксперимента согласуются с литературными данными о связи психосоциального стресса с уменьшением длины теломер [60,163]. При этом изменение условий содержания представляло собой комплексное воздействие, включавшее разрыв устойчивых социальных связей, перевод на индивидуальное содержание и изменение пространственных условий, поэтому вклад отдельных компонентов данного воздействия не оценивался.

Основной и дополнительный эксперименты были выполнены на разных видах макак. В связи с этим результаты, полученные у яванских макак, не использовались для прямого количественного сравнения с показателями макак резусов, а рассматривались как подтверждение способности перехода от группового к индивидуальному содержанию сопровождаться быстрым уменьшением длины теломер у приматов. Предполагается сходство общей направленности стресс-ассоциированных процессов, но не полная эквивалентность исходных значений, выраженности эффекта и его временной динамики у двух видов, относящихся к одному роду животных [183].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хроническое воздействие этанола представляет собой сложный патогенный фактор, способный инициировать взаимосвязанные метаболические, гепатобилиарные, иммунные, нейроэндокринные и молекулярно-клеточные нарушения. Формирование алкоголь-ассоциированной патологии определяется не только уровнем и продолжительностью воздействия, но и исходным состоянием организма, индивидуальной чувствительностью, активностью адаптационно-компенсаторных механизмов и влиянием сопутствующих повреждающих факторов. В связи с этим отдельные звенья патологического процесса могут возникать неодновременно и обладать различной чувствительностью к одному и тому же этиологическому воздействию.

Одной из предполагаемых молекулярных мишеней хронического воздействия этанола являются теломеры. Уменьшение их длины может быть связано с окислительным повреждением ДНК, воспалением, изменением пролиферативной активности клеток, нарушением нейроэндокринной регуляции и перестройкой клеточного состава крови. Вместе с тем результаты клинических и эпидемиологических исследований связи потребления алкоголя с длиной теломер остаются противоречивыми. В одних работах у лиц, употребляющих алкоголь, выявляют более короткие теломеры, тогда как в других статистически значимая связь отсутствует.

Противоречивость данных, полученных у людей, обусловлена не только различиями методов определения длины теломер и оценки алкогольной экспозиции. Потребление алкоголя обычно сочетается с широким комплексом факторов, которые сами способны влиять на динамику длины теломер, такими как курение, особенности питания, психосоциальный стресс, воспалительные и метаболические нарушения, заболевания печени и других органов, изменения состава лейкоцитарных популяций и социально-поведенческие особенности. Поэтому установленная в клиническом исследовании ассоциация между употреблением алкоголя и меньшей длиной теломер не позволяет однозначно

заклучить, являлся ли этанол самостоятельной причиной их укорочения либо наблюдаемый эффект сформировался вследствие сочетанного действия сопутствующих факторов.

Использование модели хронического добровольного потребления этанола у лабораторных приматов позволило существенно ограничить влияние подобных неконтролируемых переменных. Животные находились в стандартизированных условиях, получали одинаковый рацион, а уровень потребления этанола определяли непосредственно и сопоставляли с его концентрацией в крови. Продольный дизайн обеспечивал оценку изменений у одних и тех же животных в течение длительного периода, а дополнительное изучение показателей окислительного стресса, клеточного состава крови, возраста и условий содержания позволило рассмотреть основные факторы, потенциально участвующие в изменении длины теломер.

В условиях свободного выбора между водой и 4 % раствором этанола у макаков резусов сформировались устойчивые индивидуальные уровни потребления. Медиана потребления в группе ВПЭ достигала 3,03 г/кг в сутки, а связь количества потребляемого этанола с его концентрацией в крови подтверждала наличие длительного системного воздействия. Биологическая эффективность модели проявлялась снижением массы тела, нарушением липидного обмена, повышением активности гамма-глутамилтрансферазы и содержания билирубина, соответствующим формированию холестатического синдрома, а также изменениями лейкоцитарного профиля и нейроэндокринного ответа.

Таким образом, отсутствие уменьшения длины теломер наблюдалось не при отсутствии биологического действия этанола. Хроническая экспозиция сопровождалась системными функционально-метаболическими нарушениями, однако не приводила к выраженному цитолитическому синдрому и формированию структурных изменений печени и сердца, оцененных согласно ультразвуковому исследованию. Эти результаты соответствуют этапу патологического процесса, при котором ранние метаболические и

функциональные нарушения предшествуют развитию тяжелого органного повреждения.

Изменения клеточного состава крови также характеризовались преимущественно функциональной и обратимой направленностью. Общее количество лейкоцитов оставалось стабильным, тогда как к завершению эксперимента в обеих группах увеличивалась относительная доля моноцитов. Отсутствие моноцитоза после периода лишения этанола указывает на обратимость данного изменения. Транзиторное снижение количества эритроцитов и гематокрита в группе ВПЭ в период лишения не сопровождалось выходом показателей за пределы физиологического диапазона, клиническими признаками абстинентного синдрома или признаками устойчивого угнетения кроветворения.

При оценке прооксидантно-антиоксидантного состояния установлено, что первоначальное повышение содержания ТБК-активных продуктов имело транзиторный характер. В дальнейшем показатель снижался в обеих группах, а устойчивых межгрупповых различий не наблюдалось. Каталазная активность также не демонстрировала последовательного отклонения от исходного уровня. Следовательно, при достигнутой экспозиции хроническое потребление этанола не сопровождалось развитием выраженного системного окислительного стресса. Это свидетельствует о том, что один из основных предполагаемых механизмов ускоренного повреждения теломер в проведенном эксперименте не получил выраженного развития.

Основным результатом исследования стало отсутствие уменьшения средней длины теломер лейкоцитов при хроническом воздействии этанола на протяжении 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 данного показателя. К завершению наблюдения средняя длина теломер превышала исходные значения и находилась в диапазоне, установленном у интактных животных, содержащихся в социальных группах.

Полученные данные позволяют заключить, что при исследованном уровне и продолжительности экспозиции этанол не являлся достаточным самостоятельным этиологическим фактором укорочения теломер, несмотря на развитие ранних системных функционально-метаболических нарушений. Этот вывод не означает отсутствия патогенного действия этанола и не исключает укорочения теломер при более высокой экспозиции, развитии выраженного окислительного стресса, воспаления или органной патологии.

Особое значение для интерпретации динамики длины теломер имело исследование влияния условий содержания. Первый забор крови в эксперименте по хроническому потреблению этанола проводили после перевода животных из социальных групп в индивидуальные клетки. Таким образом, исходные значения длины теломер отражали состояние животных уже после изменения условий содержания.

В дополнительном эксперименте был воспроизведен аналогичный переход из группового содержания в условия индивидуального содержания. Через 60 суток средняя длина теломер уменьшилась на 5,5 т.п.о., а достигнутые значения оказались сопоставимы с исходным уровнем, зарегистрированным в основном эксперименте. Полученные данные позволяют рассматривать предшествовавшее изменение условий содержания как один из факторов, определивших относительно низкие исходные значения длины теломер.

Последующее увеличение средней длины теломер может отражать адаптацию организма животных к новым условиям содержания и восстановление показателя после первоначального снижения. Поэтому наблюдавшаяся динамика не является доказательством непосредственного удлиняющего или защитного действия этанола на теломеры. Активность теломеразы, альтернативные механизмы удлинения и репарация теломерной ДНК в настоящей работе непосредственно не исследовались.

Дополнительный эксперимент показывает, что изменение условий содержания может существенно влиять на длину теломер и должно учитываться при планировании и интерпретации результатов длительных исследований на

приматах. Поскольку переход к индивидуальному содержанию одновременно включал изменение социальных и пространственных условий, вклад отдельных компонентов этого воздействия в настоящей работе не разграничивался.

Это имеет значение и при интерпретации клинических исследований. Потребление алкоголя у людей часто сочетается с хроническим стрессом, нарушениями сна и питания, соматическими заболеваниями, воспалительными и метаболическими нарушениями, каждый из которых способен влиять на длину теломер. Поэтому выявляемая ассоциация употребления алкоголя с меньшей длиной теломер может отражать совокупное действие нескольких факторов и не позволяет однозначно выделить непосредственный эффект этанола.

Полученные в настоящей работе данные не позволяют непосредственно переносить результаты экспериментальной модели на все варианты потребления алкоголя человеком, однако показывают необходимость отдельного рассмотрения действия этанола и сопутствующих факторов в рамках сложного многофакторного патологического процесса.

В отношении патогенеза результаты работы свидетельствуют о неодновременности развития отдельных звеньев алкоголь-индуцированной патологии. Нарушения липидного обмена, гепатобилиарной функции, клеточного состава крови и нейроэндокринной регуляции формировались при отсутствии выраженного системного окислительного стресса, структурного повреждения органов и уменьшения длины теломер. Это подтверждает различную чувствительность органов, систем и молекулярных мишеней к одному этиологическому фактору и указывает на необходимость оценки не одного изолированного показателя, а совокупности функциональных, биохимических и молекулярных изменений.

Таким образом, хроническое добровольное потребление этанола макаками резусами 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 сопровождался быстрым и выраженным

уменьшением длины теломер. Динамика длины теломер у приматов определяется взаимодействием повреждающих и адаптационно-компенсаторных процессов и зависит от исходного состояния организма, последовательности воздействий и условий их реализации.

Полученные результаты расширяют представления о патогенезе молекулярно-клеточных изменений при хроническом воздействии этанола и свидетельствуют о том, что укорочение теломер нельзя рассматривать как обязательное непосредственное следствие алкогольной экспозиции. При интерпретации длины теломер как биомаркера необходимо учитывать сопутствующие соматические и психосоциальные факторы, способные как усиливать повреждение теломер, так и определять направление их изменений независимо от исследуемого воздействия.

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.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным является 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. Это позволит разграничить изменение длины теломер отдельных популяций клеток и изменение среднего показателя, обусловленное перераспределением клеточных популяций периферической крови.

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. Особый интерес представляет исследование механизмов стресс-ассоциированного укорочения теломер, временной динамики этого процесса и возможности восстановления показателя при адаптации животных к изменившимся условиям содержания.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 36B4 – ген рибосомального белка P0 (однокопийный контрольный ген для ПЦР)
- ALT – alternative lengthening of telomeres (альтернативное удлинение теломер)
- ATM – ataxia telangiectasia mutated (протеинкиназа, активируемая повреждениями ДНК)
- ATR – ataxia telangiectasia and Rad3-related (протеинкиназа, активируемая повреждениями ДНК)
- FISH – fluorescence in situ hybridization (флуоресцентная гибридизация in situ)
- Flow-FISH – flow cytometry fluorescence in situ hybridization (флуоресцентная гибридизация in situ с использованием проточной цитометрии)
- hTERT – human telomerase reverse transcriptase (обратная транскриптаза теломеразы человека)
- IL-6 – interleukin-6 (интерлейкин-6)
- MMqPCR – monochrome multiplex quantitative polymerase chain reaction (монохромная мультиплексная количественная полимеразная цепная реакция)
- Q-FISH – quantitative fluorescence in situ hybridization (количественная флуоресцентная гибридизация in situ)
- qPCR – quantitative polymerase chain reaction (количественная полимеразная цепная реакция)
- ROX – reference dye (флуоресцентный краситель для калибровки в ПЦР)
- STAR – single telomere absolute-length rapid assay (быстрый анализ абсолютной длины отдельных теломер)
- STELA – single telomere length analysis (анализ длины отдельных теломер)
- STS – short telomere syndromes (синдромы коротких теломер)
- TCA – telomere length combing assay (анализ длины теломер методом молекулярного «расчесывания» ДНК)
- TERC (hTR) – telomerase RNA component / human telomerase RNA (РНК-компонент теломеразы)

TERRA – telomeric repeat-containing RNA (теломерная некодирующая РНК, содержащая теломерные повторы)

TeSLA – telomere shortest length assay (анализ наиболее коротких теломер)

TRF – telomere restriction fragment (фрагмент рестрикции теломер; метод анализа длины теломер)

U-STELA – universal single telomere length analysis (универсальный анализ длины отдельных теломер)

β -глобин – контрольный однокопийный ген для ПЦР

γ -H2AX – фосфорилированная форма гистона H2AX, маркер двуцепочечных разрывов ДНК

АФК – активные формы кислорода

ВПЭ – высокое потребление этанола

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

НПЭ – низкое потребление этанола

ПЦР (PCR) – полимеразная цепная реакция

ТБК – тиобарбитуровая кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Poznyak, V. Global status report on alcohol and health 2018. / V. Poznyak, D. Rekve // Geneva: World Health Organization. – 2018. – P. 472.
2. Varghese, J. Effects of Alcohol Consumption on Various Systems of the Human Body: A Systematic Review / J. Varghese, S. Dakhode // Cureus. – Vol. 14. – N 10. – P. e30057.
3. Газатова, Н.Д. Особенности клеточного иммунитета и регенерации при алкогольном фиброзе печени / Н.Д. Газатова, К. А. Юрова, Д. В. Гаврилов [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18. – № 1. – С. 175-189.
4. Miller, A.M. Molecular mechanisms of alcoholic liver disease: innate immunity and cytokines / A.M. Miller, S. Radaeva, N. Noriguchi [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. – 2011. – Vol. 35 – N 5. – P. 787–793.
5. Barr, T. Opposing effects of alcohol on the immune system / T. Barr, C. Helms, K. Grant, I. Messaoudi // Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. – 2016. – Vol. 65. – P. 242-251.
6. Weiner, J.L. Ethanol modulation of GABAergic transmission: the view from the slice / J.L. Weiner, C.F. Valenzuela // Pharmacology & Therapeutics. – 2006. – Vol. 111. – N 3. – P. 533-554.
7. Kupari, M. Comparison of the cardiotoxicity of ethanol in women versus men / M. Kupari, P. Koskinen // The American Journal of Cardiology. – 1992. – Vol. 70. – N 6. – P. 645-649.
8. Rampoldi, A. Cardiac Toxicity From Ethanol Exposure in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes / A. Rampoldi, M. Singh, Q. Wu [et al.] // Toxicological Sciences. – 2019. – Vol. 169. – N 1. – P. 280-292.
9. Anderson, B.O. Health and cancer risks associated with low levels of alcohol consumption / B.O. Anderson, N. Berdzuli, A. Ilbawi [et al.] // The Lancet. Public Health. – 2023. – Vol. 8. – N 1. – P. e6-e7.
10. Manthey, J. Alcohol and health / J. Manthey, K. Shield, J. Rehm // Lancet (London, England). – 2022. – Vol. 400. – N 10365. – P. 1764-1765.

11. Li, Y. Analysis of telomerase activity based on a spired DNA tetrahedron TS primer: Special Issue: BIOSENSORS 2014 / Y. Li, Y. Wen, L. Wang [et al.] // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – Vol. 67. – P. 364-369.
12. Martínez, P. Telomere-driven diseases and telomere-targeting therapies / P. Martínez, M.A. Blasco // The Journal of Cell Biology. – 2017. – Vol. 216. – N 4. – P. 875-887.
13. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains / L. Hayflick // Experimental Cell Research. – 1965. – Vol. 37. – P. 614-636.
14. Драпкина, О.М. Теломеры и теломеразный комплекс. Основные клинические проявления генетического сбоя / О.М. Драпкина, Р.Н. Шепель // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2015. – Т. 14. – № 1. – С. 70-77.
15. Спивак, И.М. Длина теломер, активность теломеразы, стресс и старение / И.М. Спивак, В.М. Михельсон, Д.Л. Спивак // Успехи геронтологии. – 2015. – №3. – С. 44-51.
16. Semeraro, M.D. Physical activity, a modulator of aging through effects on telomere biology / M.D. Semeraro, C. Smith, M. Kaiser [et al.] // Aging (Albany NY). – 2020. – Vol. 12. – N 13. – P. 13803-13823.
17. Weischer, M. Telomere Shortening Unrelated to Smoking, Body Weight, Physical Activity, and Alcohol Intake: 4,576 General Population Individuals with Repeat Measurements 10 Years Apart / M. Weischer, S. E. Bojesen, B.G. Nordestgaard // PLoS Genetics. – 2014. – Vol. 10. – N 3. – P. e1004191.
18. Dixit, S. Alcohol consumption and leukocyte telomere length / S. Dixit, M.A. Whooley, E. Vittinghoff [et al.] // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9.
19. Panchenko, A.V. Association of alcohol consumption with telomere length in humans: a systematic review / A.V. Panchenko, A.B. Панченко, A.A. Agumava [et al.] // Ekologiya cheloveka (Human Ecology). – 2022. – Vol. 29. – N 12. – P. 831-854.
20. Gardner, J.P. Telomere Dynamics in Macaques and Humans / J.P. Gardner, M. Kimura, W. Chai [et al.] // The Journals of Gerontology: Series A. – 2007. – Vol. 62. – N 4. – P. 367-374.

21. Takubo, K. Telomere lengths are characteristic in each human individual / K. Takubo, N. Izumiyama-Shimomura, N. Honma [et al.] // *Experimental Gerontology*. – 2002. – Vol. 37. – N 4. – P. 523-531.
22. Sanders, J. Telomere Length in Epidemiology: A Biomarker of Aging, Age-Related Disease, Both, or Neither? / J. Sanders, A. Newman // *Epidemiologic reviews*. – 2013. – Vol. 35.
23. Koliada, A.K. Telomeric aging: mitotic clock or stress indicator? / A.K. Koliada, D.S. Krasnenkov, A.M. Vaiserman // *Frontiers in Genetics*. – 2015. – Vol. 6.
24. Notterman, D.A. Telomere Time-Why We Should Treat Biological Age Cautiously / D.A. Notterman, L. Schneper // *JAMA network open*. – 2020. – Vol. 3. – N 5. – P. e204352.
25. Carvalho, L.F.C.S. Can ethanol affect the cell structure? A dynamic molecular and Raman spectroscopy study / L.F.C.S. Carvalho, L. dos Santos, F. Bonnier [et al.] // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2020. – Vol. 30. – P. 101675.
26. Young, T.A. Chronic ethanol consumption decreases mitochondrial and glycolytic production of ATP in liver / T.A. Young, S.M. Bailey, C.G. Van Horn, C.C. Cunningham // *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*. – 2006. – Vol. 41. – N 3. – P. 254-260.
27. Wu, D. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage / D. Wu, A.I. Cederbaum // *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. – 2003. – Vol. 27. – N 4. – P. 277-284.
28. Бохан, Н.А. Окислительный стресс и его коррекция у больных алкогольной зависимостью: итоги исследований в НИИ психического здоровья Томского НИМЦ / Н.А. Бохан, В.Д. Прокопьева, С.А. Иванова [и др.] // *Вопросы наркологии*. – 2018. – Т. 163. – № 3. – С. 27-59.
29. Прокопьева, В.Д. Показатели антиоксидантной системы и дофамина плазмы крови в динамике микроволновой резонансной терапии у больных алкоголизмом / В.Д. Прокопьева, Е.Г. Ярыгина, Н.М. Кротенко [и др.] // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2017. – № 9. – С. 67-70.

30. Uziel, O. Oxidative stress causes telomere damage in Fanconi anaemia cells - a possible predisposition for malignant transformation / O. Uziel, H. Reshef, A. Ravid [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 2008. – Vol. 142. – N 1. – P. 82-93.
31. Harpaz, T. The Effect of Ethanol on Telomere Dynamics and Regulation in Human Cells / T. Harpaz, H. Abumock, E. Beery [et al.] // *Cells*. – 2018. – Vol. 7. – N 10. – P. 169.
32. Dong, R. Yangonin inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via miR-194/FXR axis / R. Dong, X. Wang, L. Wang [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2021. – Vol. 890. – P. 173653.
33. Santillano, D.R. Ethanol induces cell-cycle activity and reduces stem cell diversity to alter both regenerative capacity and differentiation potential of cerebral cortical neuroepithelial precursors / D.R. Santillano, L.S. Kumar, T.L. Prock [et al.] // *BMC Neuroscience*. – 2005. – Vol. 6. – P. 59.
34. Jin, H. Oroxylin A inhibits ethanol-induced hepatocyte senescence via YAP pathway / H. Jin, N. Lian, M. Bian [et al.] // *Cell Proliferation*. – 2018. – Vol. 51. – N 3. – P. e12431.
35. Moazzam, M. Analysis of telomere length variation and Shelterin complex subunit gene expression changes in ethanol-exposed human embryonic stem cells / M. Moazzam, T. Yim, V.D. Kumaresan [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2021. – Vol. 143. – P. 543-549.
36. Romano, G.H. Environmental Stresses Disrupt Telomere Length Homeostasis / G.H. Romano, Y. Harari, T. Yehuda [et al.] // *PLoS Genetics*. – 2013. – Vol. 9. – N 9. – P. e1003721.
37. Moraes, I.B. Ethanol Preference Leads to Alterations in Telomere Length, Mitochondria Copy Number, and Antioxidant Enzyme Activity in Zebrafish Brains / I.B. Moraes, I.M. Paiva, R.E. Moreira-Júnior [et al.] // *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*. – 2023. – Vol. 28. – N 4. – P. 73.
38. Garcia-Moruno, E. Effect of long-term moderate red wine consumption in CD1 female mice / E. Garcia-Moruno, A.-B. Blázquez, N. Jiménez de Oya [et al.] // *Food & Function*. – 2025. – Vol. 16. – N 7. – P. 2656-2668.

39. Zglinicki, T. von. Oxidative stress shortens telomeres / T. von Zglinicki // Trends in Biochemical Sciences. – 2002. – Vol. 27. – N 7. – P. 339-344.
40. Анисимов, В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: монография / В. Н. Анисимов. – Санкт-Петербург: Изд-во Наука, 2003.
41. Shively, C.A. Social Stress, Visceral Obesity, and Coronary Artery Atherosclerosis: Product of a Primate Adaptation / C.A. Shively, T.C. Register, T.B. Clarkson // American journal of primatology. – 2009. – Vol. 71. – N 9. – P. 742-751.
42. Palm, W. How shelterin protects mammalian telomeres / W. Palm, T. de Lange // Annual Review of Genetics. – 2008. – Vol. 42. – P. 301-334.
43. Zinder, J.C. Shelterin is a dimeric complex with extensive structural heterogeneity / J.C. Zinder, P.D.B. Olinares, V. Svetlov [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2022. – Vol. 119. – N 31. – P. e2201662119.
44. Blackburn, E.H. Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection / E.H. Blackburn, E.S. Epel, J. Lin // Science (New York, N.Y.). – 2015. – Vol. 350. – N 6265. – P. 1193-1198.
45. Okuda, K. Telomere length in the newborn / K. Okuda, A. Bardeguet, J.P. Gardner [et al.] // Pediatric Research. – 2002. – Vol. 52. – N 3. – P. 377-381.
46. Luo, Y. Massively parallel single-molecule telomere length measurement with digital real-time PCR / Y. Luo, R. Viswanathan, M.P. Hande [et al.] // Science Advances. – 2020. – Vol. 6. – N 34. – P. eabb7944.
47. Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres / E.H. Blackburn // Nature. – 1991. – Vol. 350. – N 6319. – P. 569-573.
48. Olovnikov, A.M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon / A.M. Olovnikov // Journal of Theoretical Biology. – 1973. – Vol. 41. – N 1. – P. 181-190.
49. Panossian, L.A. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status / L.A. Panossian, V.R. Porter, H.F. Valenzuela [et al.] // Neurobiology of Aging. – 2003. – Vol. 24. – N 1. – P. 77-84.

50. Sampson, M.J. Monocyte telomere shortening and oxidative DNA damage in type 2 diabetes / M.J. Sampson, M.S. Winterbone, J.C. Hughes [et al.] // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29. – N 2. – P. 283-289.
51. Epel, E.S. The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men: a novel demonstration / E.S. Epel, S.S. Merkin, R. Cawthon [et al.] // *Aging*. – 2008. – Vol. 1. – N 1. – P. 81-88.
52. Frías, C. Telomere shortening is associated with poor prognosis and telomerase activity correlates with DNA repair impairment in non-small cell lung cancer / C. Frías, C. García-Aranda, C. De Juan [et al.] // *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*. – 2008. – Vol. 60. – N 3. – P. 416-425.
53. Armanios, M. The Role of Telomeres in Human Disease / M. Armanios // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2022. – Vol. 23. – P. 363-381.
54. Canela, A. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies / A. Canela, E. Vera, P. Klatt, M.A. Blasco // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104. – N 13. – P. 5300-5305.
55. Vera, E. The rate of increase of short telomeres predicts longevity in mammals / E. Vera, B. Bernardes de Jesus, M. Foronda [et al.] // *Cell Reports*. – 2012. – Vol. 2. – N 4. – P. 732-737.
56. Zijlmans, J.M.J.M. Telomeres in the mouse have large inter-chromosomal variations in the number of T2AG3 repeats / J.M.J.M. Zijlmans, U.M. Martens, S.S.S. Poon [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94. – N 14. – P. 7423-7428.
57. Whittemore, K. Telomere shortening rate predicts species life span / K. Whittemore, E. Vera, E. Martínez-Nevado [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2019. – Vol. 116. – N 30. – P. 15122-15127.
58. Grach A. Telomere Shortening Mechanisms / A. Grach // *The Mechanisms of DNA Replication*. IntechOpen. – 2013.
59. Ilmonen, P. Telomere Attrition Due to Infection / P. Ilmonen, A. Kotrschal, D.J. Penn // *PLoS ONE*. – 2008. – Vol. 3. – N 5.

60. Epel, E.S. Accelerated telomere shortening in response to life stress / E.S. Epel, E.H. Blackburn, J. Lin [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101. – N 49. – P. 17312-17315.
61. Boccardi, M. Psychological Wellbeing and Healthy Aging: Focus on Telomeres / M. Boccardi, V. Boccardi // *Geriatrics (Basel, Switzerland)*. – 2019. – Vol. 4. – N 1. – P. 25.
62. Canudas, S. Mediterranean Diet and Telomere Length: A Systematic Review and Meta-Analysis / S. Canudas, N. Becerra-Tomás, P. Hernández-Alonso [et al.] // *Advances in Nutrition*. – 2020. – Vol. 11. – N 6. – P. 1544-1554.
63. Galiè, S. Impact of Nutrition on Telomere Health: Systematic Review of Observational Cohort Studies and Randomized Clinical Trials / S. Galiè, S. Canudas, J. Muralidharan [et al.] // *Advances in Nutrition*. – 2020. – Vol. 11. – N 3. – P. 576-601.
64. Astuti, Y. Cigarette smoking and telomere length: A systematic review of 84 studies and meta-analysis / Y. Astuti, A. Wardhana, J. Watkins [et al.] // *Environmental Research*. – 2017. – Vol. 158. – P. 480.
65. Chen, L. Loss of Human TGS1 Hypermethylase Promotes Increased Telomerase RNA and Telomere Elongation / L. Chen, C.M. Roake, A. Galati [et al.] // *Cell Reports*. – 2020. – Vol. 30. – N 5. – P. 1358-1372.e5.
66. Srinivas, N. Telomeres and Telomere Length: A General Overview / N. Srinivas, S. Rachakonda, R. Kumar // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – N 3. – P. 558.
67. Chiba, K. Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism / K. Chiba, F.K. Lorbeer, A.H. Shain [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2017. – Vol. 357. – N 6358.
68. Fajkus, P. Allium telomeres unmasked: the unusual telomeric sequence (CTCGGTTATGGG)_n is synthesized by telomerase / P. Fajkus, V. Peška, Z. Šitová [et al.] // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2016. – Vol. 85. – N 3. – P. 337-347.
69. Xu, S. A quantitative method to measure telomerase activity by bioluminescence connected with telomeric repeat amplification protocol / S. Xu, M. He, H. Yu [et al.] // *Analytical biochemistry*. – 2001. – Vol. 299. – N 2. – P. 188-193.

70. Ramlee, M.K. Transcription Regulation of the Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) Gene / M.K. Ramlee, J. Wang, W. X. Toh, S. Li // *Genes*. – 2016. – Vol. 7. – N 8. – P. 50.
71. Plyasova, A.A. Alternative Splicing of Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) and Its Implications in Physiological and Pathological Processes / A.A. Plyasova, D.D. Zhdanov // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9. – N 5. – P. 526.
72. Martinez, P. An enzyme to cure age-related diseases / P. Martinez, M.A. Blasco // *Nature Catalysis*. – 2021. – Vol. 4. – N 9. – P. 738-739.
73. Azzalin, C.M. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends / C.M. Azzalin, P. Reichenbach, L. Khoraiuli [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2007. – Vol. 318. – N 5851. – P. 798-801.
74. Cusanelli, E. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity / E. Cusanelli, P. Chartrand // *Front Genet*. – 2015. – Vol. 6. – P. 143.
75. Blasco, M.A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres / M.A. Blasco // *Nature Reviews. Genetics*. – 2007. – Vol. 8. – N 4. – P. 299-309.
76. Rosenfeld, J.A. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome / J.A. Rosenfeld, Z. Wang, D.E. Schones [et al.] // *BMC genomics*. – 2009. – Vol. 10. – P. 143.
77. García-Cao, M. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases / M. García-Cao, R. O'Sullivan, A.H.F.M. Peters [et al.] // *Nature Genetics*. – 2004. – Vol. 36. – N 1. – P. 94-99.
78. Fodor, B.D. Mammalian Su(var) genes in chromatin control / B.D. Fodor, N. Shukeir, G. Reuter, T. Jenuwein // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. – 2010. – Vol. 26. – P. 471-501.
79. Iglesias, N. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast / N. Iglesias, S. Redon, V. Pfeiffer [et al.] // *EMBO reports*. – 2011. – Vol. 12. – N 6. – P. 587-593.
80. Thomas, P. Telomere length in white blood cells, buccal cells and brain tissue and its variation with ageing and Alzheimer's disease / P. Thomas, N.J.O' Callaghan, M.

Fenech // Mechanisms of Ageing and Development. – 2008. – Vol. 129. – N 4. – P. 183-190.

81. Vertecchi, E. Telomere Targeting Approaches in Cancer: Beyond Length Maintenance / E. Vertecchi, A. Rizzo, E. Salvati // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – N 7. – P. 3784.

82. Demanelis, K. Determinants of telomere length across human tissues / K. Demanelis, F. Jasmine, L.S. Chen [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2020. – Vol. 369. – N 6509.

83. Lin, J. Systematic and Cell Type-Specific Telomere Length Changes in Subsets of Lymphocytes / J. Lin, J. Cheon, R. Brown [et al.] // Journal of Immunology Research. – 2016. – Vol. 2016. – P. 5371050.

84. Lin, Y. Age-associated telomere attrition of lymphocytes in vivo is co-ordinated with changes in telomerase activity, composition of lymphocyte subsets and health conditions / Y. Lin, A. Damjanovic, E.J. Metter [et al.] // Clinical science (London, England : 1979). – 2015. – Vol. 128. – N 6. – P. 367-377.

85. Daniali, L. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults / L. Daniali, A. Benetos, E. Susser [et al.] // Nature Communications. – 2013. – Vol. 4. – P. 1597.

86. Lingner, J. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging strand problem? / J. Lingner, J.P. Cooper, T.R. Cech // Science (New York, N.Y.). – 1995. – Vol. 269. – N 5230. – P. 1533-1534.

87. Fumagalli, M. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA damage response activation / M. Fumagalli, F. Rossiello, M. Clerici [et al.] // Nature cell biology. – 2012. – Vol. 14. – N 4. – P. 355-365.

88. Hayashi, M.T. A Telomere Dependent DNA Damage Checkpoint Induced by Prolonged Mitotic Arrest / M.T. Hayashi, A.J. Cesare, J.A.J. Fitzpatrick [et al.] // Nature structural & molecular biology. – 2012. – Vol. 19. – N 4. – P. 387-394.

89. Coluzzi E. Transient ALT activation protects human primary cells from chromosome instability induced by low chronic oxidative stress / E. Coluzzi, R. Buonsante, S. Leone [et al.] // Sci Rep. Nature Publishing Group – 2017. – Vol. 7 – N 1. – P. 43309.

90. Patra, M. Under the Influence of Alcohol: The Effect of Ethanol and Methanol on Lipid Bilayers / M. Patra, E. Salonen, E. Terama [et al.] // *Biophysical Journal*. – 2006. – Vol. 90. – N 4. – P. 1121-1135.
91. Holmuhamedov, E. Ethanol exposure decreases mitochondrial outer membrane permeability in cultured rat hepatocytes / E. Holmuhamedov, J.J. Lemasters // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2009. – Vol. 481. – N 2. – P. 226-233.
92. Tsermpini, E.E. Alcohol-Induced Oxidative Stress and the Role of Antioxidants in Alcohol Use Disorder: A Systematic Review / E.E. Tsermpini, A. Plemenitaš Ilješ, V. Dolžan // *Antioxidants*. – 2022. – Vol. 11. – N 7. – P. 1374.
93. Topiwala, A. Alcohol consumption and telomere length: Mendelian randomization clarifies alcohol's effects / A. Topiwala, B. Taschler, K.P. Ebmeier [et al.] // *Molecular Psychiatry*. – 2022. – Vol. 27. – N 10. – P. 4001-4008.
94. Hovatta, I. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders / I. Hovatta, J. Juhila, J. Donner // *Neuroscience Research*. – 2010. – Vol. 68. – N 4. – P. 261-275.
95. Волкова, М.В. Современные биомаркеры окислительного стресса, оцениваемые методом иммуноферментного анализа / М.В. Волкова, Ю.И. Рагино // *Атеросклероз*. – 2021. – Т. 17. – № 4.
96. Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage / E. Albano // *Proceedings of the Nutrition Society*. – 2006. – Vol. 65. – N 3. – P. 278-290.
97. Высокогорский, В.Е. Нарушение обмена глутатиона при алкоголизме. / В.Е. Высокогорский, Е.С. Ефременко, Д.Е. Быков [и др.] // *Омский научный вестник*. – 2011. – № 1. – С. 9-12.
98. Jimenez, V.A. Studies using macaque monkeys to address excessive alcohol drinking and stress interactions / V.A. Jimenez, K.A. Grant // *Neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 122. – P. 127-135.
99. Sinha, R. Alcohols Negative Emotional Side: The Role of Stress Neurobiology in Alcohol Use Disorder / R. Sinha // *Alcohol Research: Current Reviews*. – 2022. – V. 42. – N 1. – P. 12.
100. Tang, L.-J. Telomerase: a key player in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease? / L.-J. Tang, R.S. Rios, H. Zhang [et al.] // *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*. – 2021. – Vol. 15. – N 7. – P. 811-819.

101. Bountziouka, V. Modifiable traits, healthy behaviours, and leukocyte telomere length: a population-based study in UK Biobank / V. Bountziouka, C. Musicha, E. Allara [et al.] // *The Lancet. Healthy Longevity*. – 2022. – Vol. 3. – N 5. – P. e321-e331.
102. Pavanello, S. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption / S. Pavanello, M. Hoxha, L. Dioni [и др.] // *International Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 129. – N 4. – P. 983-992.
103. Shin, C. Associations Between Alcohol Consumption and Leukocyte Telomere Length Modified by a Common Polymorphism of ALDH2 / C. Shin, I. Baik // *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. – 2016. – Vol. 40. – N 4. – P. 765-771.
104. Yamaki, N. Telomere shortening in alcohol dependence: Roles of alcohol and acetaldehyde / N. Yamaki, S. Matsushita, S. Hara [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. – 2019. – Vol. 109. – P. 27-32.
105. Martins de Carvalho, L. Effect of alcohol use disorder on cellular aging / L. Martins de Carvalho, C.E. Wiers, P. Manza [et al.] // *Psychopharmacology*. – 2019. – Vol. 236. – N 11. – P. 3245-3255.
106. Känel, R. von. Comparison of telomere length in black and white teachers from South Africa: the sympathetic activity and ambulatory blood pressure in Africans study / R. von Känel, N.T. Malan, M. Hamer, L. Malan // *Psychosomatic Medicine*. – 2015. – Vol. 77. – N 1. – P. 26-32.
107. Känel, R. von. Association between objectively measured physical activity, chronic stress and leukocyte telomere length / R. von Känel, E.J. Bruwer, M. Hamer [et al.] // *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. – 2017. – Vol. 57. – N 10. – P. 1349-1358.
108. Wang, H. Associations of alcohol consumption and alcohol flush reaction with leukocyte telomere length in Korean adults / H. Wang, H. Kim, I. Baik // *Nutrition Research and Practice*. – 2017. – Vol. 11. – N 4. – P. 334-339.
109. Aida, J. Telomere shortening in the oral epithelium in relation to alcohol intake, alcohol dehydrogenase (ADH-1B), and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH-2) genotypes and clinicopathologic features / J. Aida, A. Yokoyama, S. Hara [et al.] //

Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. – 2020. – Vol. 49. – N 1. – P. 82-90.

110. Strandberg, T.E. Association between alcohol consumption in healthy midlife and telomere length in older men. The Helsinki Businessmen Study / T.E. Strandberg, A.Y. Strandberg, O. Saijonmaa [et al.] // European Journal of Epidemiology. – 2012. – Vol. 27. – N 10. – P. 815-822.

111. Révész, D. Baseline biopsychosocial determinants of telomere length and 6-year attrition rate / D. Révész, Y. Milaneschi, E.M. Terpstra, B.W.J.H. Penninx // Psychoneuroendocrinology. – 2016. – Vol. 67. – P. 153-162.

112. Vyas, C.M. Telomere length and its relationships with lifestyle and behavioural factors: variations by sex and race/ethnicity / C.M. Vyas, S. Ogata, C.F. Reynolds [et al.] // Age and Ageing. – 2020. – Vol. 50. – N 3. – P. 838-846.

113. Fyhrquist, F. Telomere length and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study / F. Fyhrquist, K. Silventoinen, O. Saijonmaa [et al.] // Journal of Human Hypertension. – 2011. – Vol. 25. – N 12. – P. 711-718.

114. Kozlitina, J. Red Blood Cell Size Is Inversely Associated with Leukocyte Telomere Length in a Large Multi-Ethnic Population / J. Kozlitina, C.K. Garcia // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – N 12. – P. e51046.

115. Sun, Q. Healthy Lifestyle and Leukocyte Telomere Length in U.S. Women / Q. Sun, L. Shi, J. Prescott [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – N 5. – P. e38374.

116. Liu, J.J. One-carbon metabolism factors and leukocyte telomere length / J.J. Liu, J. Prescott, E. Giovannucci [et al.] // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2013. – Vol. 97. – N 4. – P. 794-799.

117. Needham, B.L. Socioeconomic status, health behavior, and leukocyte telomere length in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2002 / B.L. Needham, N. Adler, S. Gregorich [et al.] // Social science & medicine (1982). – 2013. – Vol. 85. – P. 1.

118. Bendix, L. Longitudinal changes in leukocyte telomere length and mortality in humans / L. Bendix, M. Thinggaard, M. Fenger [et al.] // The Journals of Gerontology.

Series A, Biological Sciences and Medical Sciences. – 2014. – Vol. 69. – N 2. – P. 231-239.

119. Raymond, A.R. Relationship between average leucocyte telomere length and the presence or severity of idiopathic dilated cardiomyopathy in black Africans / A.R. Raymond, G.R. Norton, P. Sareli [et al.] // *European Journal of Heart Failure*. – 2013. – Vol. 15. – N 1. – P. 54-60.

120. De Rooij, S.R. Prenatal undernutrition and leukocyte telomere length in late adulthood: the Dutch famine birth cohort study / S.R. de Rooij, A.M.M. van Pelt, S.E. Ozanne [et al.] // *The American Journal of Clinical Nutrition*. – 2015. – Vol. 102. – N 3. – P. 655-660.

121. Latifovic, L. The Influence of Alcohol Consumption, Cigarette Smoking, and Physical Activity on Leukocyte Telomere Length / L. Latifovic, S.D. Peacock, T.E. Massey, W.D. King // *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. – 2016. – Vol. 25. – N 2. – P. 374-380.

122. Williams, D.M. Associations of Leukocyte Telomere Length With Aerobic and Muscular Fitness in Young Adults / D.M. Williams, J.L. Buxton, M.T. Kantomaa [et al.] // *American Journal of Epidemiology*. – 2017. – Vol. 185. – N 7. – P. 529-537.

123. Pavanello, S. Relationship between Telomere Length, Genetic Traits and Environmental/Occupational Exposures in Bladder Cancer Risk by Structural Equation Modelling / S. Pavanello, A. Carta, G. Mastrangelo [et al.] // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2018. – Vol. 15. – N 1. – P. 5.

124. Opstad, T.B. Shorter Leukocyte Telomere Lengths in Healthy Relatives of Patients with Coronary Heart Disease / T.B. Opstad, A.A. Kalstad, K.B. Holte [et al.] // *Rejuvenation Research*. – 2020. – Vol. 23. – N 4. – P. 324-332.

125. Honkonen, M. Leukocyte telomere length is inversely associated with arterial wave reflection in 566 normotensive and never-treated hypertensive subjects / M. Honkonen, K. Vääräniemi, O. Saijonmaa [et al.] // *Aging (Albany NY)*. – 2020. – Vol. 12. – N 12. – P. 12376-12392.

126. Ahiawodzi, P. Non-esterified fatty acids and telomere length in older adults: The Cardiovascular Health Study / P. Ahiawodzi, A. L. Fitzpatrick, L. Djousse [et al.] // *Metabolism Open*. – 2020. – Vol. 8. – P. 100058.
127. Aida, J. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus / J. Aida, A. Yokoyama, N. Izumiyama [et al.] // *The Journal of Pathology*. – 2011. – Vol. 223. – N 3. – P. 410-416.
128. Aida, J. Telomere Shortening in the Esophagus of Japanese Alcoholics: Relationships with Chromoendoscopic Findings, ALDH2 and ADH1B Genotypes and Smoking History / J. Aida, A. Yokoyama, N. Shimomura [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – N 5. – P. e63860.
129. Bijmens, E.M. Serum gamma-glutamyl transferase, a marker of alcohol intake, is associated with telomere length and cardiometabolic risk in young adulthood / E.M. Bijmens, C. Derom, E. Thiery [et al.] // *Scientific Reports*. – 2021. – Vol. 11. – P. 12407.
130. Ningarhari, M. Telomere length is key to hepatocellular carcinoma diversity and telomerase addiction is an actionable therapeutic target / M. Ningarhari, S. Caruso, T.Z. Hirsch [et al.] // *Journal of Hepatology*. – 2021. – Vol. 74. – N 5. – P. 1155-1166.
131. Kahl, V.F.S. Telomere Length Measurement by Molecular Combing / V.F.S. Kahl, J.A.M. Allen, C.B. Nelson [et al.] // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 493.
132. Lai, T.-P. A method for measuring the distribution of the shortest telomeres in cells and tissues / T.-P. Lai, N. Zhang, J. Noh [et al.] // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1356.
133. Cawthon, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR / R. M. Cawthon // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30. – N 10. – P. e47.
134. O'Callaghan, N.J. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length / N.J. O'Callaghan, M. Fenech // *Biological Procedures Online*. – 2011. – Vol. 13. – N 1. – P. 3.
135. Дмитриев, П.В. Анализ теломерной ДНК: современные подходы и методы / П.В. Дмитриев, Е.С. Васецкий // *Онтогенез* – 2009. – Т. 40. – № 3. – С. 163-184.

136. Демина, И.А. Измерение абсолютной длины теломер методом проточной цитометрии / И.А. Демина, А.А. Семченкова, З.Р. Кагирова, А.М. Попов // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. – 2019. – Т. 17. – № 4. – С. 68-74.
137. Hemann, M.T. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability / E. Vera, M.A. Strong, L.Y. Hao, C.W. Greider // Cell. – 2001. – Vol. 107. – N 1. – P. 67-77.
138. Максимов, В.Н. Ассоциация относительной длины теломер лейкоцитов со смертью от естественных причин при 15-летнем наблюдении популяционной выборки / В.Н. Максимов, А.А. Иванова, П.С. Орлов [и др.] // Успехи геронтологии. – 2023. – Т. 36. – № 5. – С. 748–755. – DOI: 10.34922/AE.2023.36.5.017.
139. Shay, J.W. Telomeres and telomerase: three decades of progress / J.W. Shay, W.E. Wright // Nature Reviews. Genetics. – 2019. – Vol. 20. – N 5. – P. 299-309.
140. Cervera-Juanes, R. MAOA expression predicts vulnerability for alcohol use / R. Cervera-Juanes, L.J. Wilhem, B. Park [et al.] // Molecular psychiatry. – 2016. – Vol. 21. – N 4. – P. 472-479.
141. Wang, H. Histopathological Features and Composition of Gut Microbiota in Rhesus Monkey of Alcoholic Liver Disease / H. Wang, Y. Yan, X. Yi [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 165.
142. Тимина, М.Ф. Некоторые показатели системы крови и окислительного стресса при хроническом потреблении алкоголя макаками-резус в модели со свободным выбором / М.Ф. Тимина, Р.М. Киргинцев, А.А. Агумава [и др.] // Вопросы наркологии. – 2023. – Т. 35. – № 2. – С. 37-51.
143. Vivian J.A. Oral ethanol self-administration in rhesus monkeys: behavioral and neurochemical correlates: 8 / J.A. Vivian, J.D. Higley, M. Linnoila [et al.] // Alcohol Clin Exp Res. 1999. T. 23, № 8. С. 1352–1361.
144. Baker, E.J. Chronic alcohol self-administration in monkeys shows long-term quantity/frequency categorical stability / E.J. Baker, J. Farro, S. Gonzales [et al.] // Alcoholism, clinical and experimental research. – 2014. – Vol. 38. – N 11. – P. 2835-2843.

145. Панченко, Ан.В. Суточный ритм потребления и концентрации этанола в крови у макак-резус при добровольном потреблении алкоголя / Ан.В. Панченко, Ал.В. Панченко, Л.Е. Павлова [и др.] // Вопросы наркологии – Т. 201. – № 6. – С. 41-52.
146. Spanagel, R. Alcoholism: a systems approach from molecular physiology to addictive behavior / R. Spanagel // Physiological Reviews. – 2009. – Vol. 89. – N 2. – P. 649-705.
147. Lin, J. Telomere length measurement by qPCR – Summary of critical factors and recommendations for assay design / J. Lin, D.L. Smith, K. Esteves, S. Drury // Psychoneuroendocrinology. – 2019. – Vol. 99. – P. 271-278.
148. Boule, L.A. Alcohol, aging, and innate immunity / L.A. Boule, E.J. Kovacs // Journal of Leukocyte Biology. – 2017. – Vol. 102. – N 1. – P. 41-55.
149. McEwen, B.S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain / B.S. McEwen // Physiological Reviews. – 2007. – Vol. 87. – N 3. – P. 873-904.
150. Picard, M. Mitochondrial allostatic load puts the «gluc» back in glucocorticoids / M. Picard, R.-P. Juster, B.S. McEwen // Nature Reviews. Endocrinology. – 2014. – Vol. 10. – N 5. – P. 303-310.
151. Kirgintsev, R.M. Indicators of spontaneous behavior of rhesus monkeys with short-term course alcohol self-administration under free choice / R.M. Kirgintsev, L.E. Pavlova, M.F. Timina [et al.] // Zhurnal Nevrologii I Psikhiiatrii Imeni S.S. Korsakova. – 2023. – Vol. 123. – N 10. – P. 106-112.
152. Inder, W.J. The acute effects of oral ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in normal human subjects / W.J. Inder, P.R. Joyce, J.E. Wells [et al.] // Clinical Endocrinology. – 1995. – Vol. 42. – N 1. – P. 65-71.
153. Koob, G.F. Neurocircuitry of addiction / G.F. Koob, N.D. Volkow // Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology. – 2010. – Vol. 35. – N 1. – P. 217-238.
154. Zhang, X. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies / X. Zhang, S. Lin, W.E. Funk, L. Hou // Occupational and Environmental Medicine. – 2013. – Vol. 70. – N 10. – P. 743-749.

155. Киргинцев Р. М. Анализ спонтанного поведения самцов макак-резус на фоне добровольного потребления раствора этанола в течение двух лет / Р.М. Киргинцев, Л.Е. Павлова, М.Ф. Тимина [и др.] // Казанский Медицинский Журнал. – 2025. – Т. 106. – № 3. – С. 397-406.
156. Tramacere, I. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: Overall results and dose-risk relation / I. Tramacere, E. Negri, V. Bagnardi [et al.] // Oral Oncology. – 2010. – Vol. 46. – N 7. – P. 497-503.
157. Brooks, P.J. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis / P.J. Brooks, J.A. Theruvathu // Alcohol (Fayetteville, N.Y.). – 2005. – Vol. 35. – N 3. – P. 187-193.
158. Chen, Y. Reference values of clinical chemistry and hematology parameters in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) / Y. Chen, S. Qin, Y. Ding [et al.] // Xenotransplantation. – 2009. – Vol. 16. – N 6. – P. 496-501.
159. Allen, D.C. Effect of repeated abstinence on chronic ethanol self-administration in the rhesus monkey / D.C. Allen, S.W. Gonzales, K.A. Grant // Psychopharmacology. – 2018. – Vol. 235. – N 1. – P. 109-120.
160. Polhuis, K.C.M.M. The Diuretic Action of Weak and Strong Alcoholic Beverages in Elderly Men: A Randomized Diet-Controlled Crossover Trial / K.C.M.M. Polhuis, A.H.C. Wijnen, A. Sierksma [et al.] // Nutrients. – 2017. – Vol. 9. – N 7. – P. 660.
161. Wezeman, F.H. Adipogenic effect of alcohol on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells / F.H. Wezeman, Z. Gong // Alcoholism, Clinical and Experimental Research. – 2004. – Vol. 28. – N 7. – P. 1091-1101.
162. Казанцева А. В. Связь вариаций относительной длины теломерных повторов с клинико-анамнестическими характеристиками пациентов с хроническим алкоголизмом / А. В. Казанцева, Г. Г. Фасхутдинова, Ю. Д. Давыдова [и др.] // Медицинская генетика. – 2022. – Т. 21. – № 7. С. 56-59.
163. Schneper, L.M. Early-Life Experiences and Telomere Length in Adult Rhesus Monkeys: An Exploratory Study / L.M. Schneper, J. Brooks-Gunn, D.A. Notterman, S.J. Suomi // Psychosomatic Medicine. – 2016. – Vol. 78. – N 9. – P. 1066-1071.

164. Kakuo, S. Human Is a Unique Species among Primates in Terms of Telomere Length / S. Kakuo, K. Asaoka, T. Ide // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1999. – Vol. 263. – N 2. – P. 308-314.
165. Smith Jr, D.L. Telomere Dynamics in Rhesus Monkeys: No Apparent Effect of Caloric Restriction / D.L. Smith Jr, J.A. Mattison, R.A. Desmond [et al.] // The Journals of Gerontology: Series A. – 2011. – Vol. 66A. – N 11. – P. 1163-1168.
166. Haussmann, M.F. Telomere length provides a new technique for aging animals / M.F. Haussmann, C.M. Vleck // Oecologia. – 2002. – Vol. 130. – N 3. – P. 325-328.
167. Wilbourn, R.V. The relationship between telomere length and mortality risk in non-model vertebrate systems: a meta-analysis / R.V. Wilbourn, J.P. Moatt, H. Froy [et al.] // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2018. – Vol. 373. – N 1741. – P. 20160447.
168. Cerchiara, J.A. Magellanic penguin telomeres do not shorten with age with increased reproductive effort, investment, and basal corticosterone / J.A. Cerchiara, R.A. Risques, D. Prunkard [et al.] // Ecology and Evolution. – 2017. – Vol. 7. – N 15. – P. 5682-5691.
169. Foley, N.M. Growing old, yet staying young: The role of telomeres in bats' exceptional longevity / N.M. Foley, G.M. Hughes, Z. Huang [et al.] // Science Advances. – 2018. – Vol. 4. – N 2. – P. eaao0926.
170. Hachmo, Y. Hyperbaric oxygen therapy increases telomere length and decreases immunosenescence in isolated blood cells: a prospective trial / Y. Hachmo, A. Hadanny, R. Abu Hamed [et al.] // Aging (Albany NY). – 2020. – Vol. 12. – N 22. – P. 22445-22456.
171. Ridout, K.K. Relationships Between Telomere Length, Plasma Glucagon-like Peptide 1, and Insulin in Early-Life Stress-Exposed Nonhuman Primates / K.K. Ridout, S.A. Syed, H.-T. Kao [et al.] // Biological Psychiatry Global Open Science. – 2022. – Vol. 2. – N 1. – P. 54-60.
172. Гальцева, И.В. Сопоставление методов полимеразной цепной реакции и проточной цитометрии для измерения длины теломер лейкоцитов человека / И.В. Гальцева, М.Л. Филипенко, Ю.О. Давыдова [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2021. – Т. 66. – № 3. – С. 154-159.

173. Aviv, A. Impartial comparative analysis of measurement of leukocyte telomere length/DNA content by Southern blots and qPCR / A. Aviv, S. C. Hunt, J. Lin [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39. – N 20. – P. e134.
174. Москалева Е.Ю. Длина теломер и активность теломеразы как биологические маркеры для диагностики и прогноза патологических нарушений / Е.Ю. Москалева, А.И. Глухов, А.С. Жирник [и др.] // *Биохимия*. – 2025. – Т. 90. – № 6. – С. 752-780.
175. Cawthon, R.M. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older / R.M. Cawthon, K.R. Smith, E. O'Brien [et al.] // *Lancet* (London, England). – 2003. – Vol. 361. – N 9355. – P. 393-395.
176. Valdes, A.M. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women / A.M. Valdes, T. Andrew, J.P. Gardner [et al.] // *Lancet* (London, England). – 2005. – Vol. 366. – N 9486. – P. 662-664.
177. Lin, J. Telomeres and lifestyle factors: Roles in cellular aging: Telomeres and disease / J. Lin, E. Epel, E. Blackburn // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2012. – Vol. 730. – N 1. – P. 85-89.
178. Бекмурзинова, Ф.К. Оценка изменения длины теломер хромосом как критерий продолжительности жизни в бариатрической практике / Ф.К. Бекмурзинова, О.Б. Оспанов, А.Р. Акильжанова [и др.] // *Ожирение и метаболизм*. – 2020. – Т. 17. – № 2. – С. 125-129.
179. Shimizu, Y. In vitro aging of macaque adherent cells: similar pattern of cellular aging between human and macaque / Y. Shimizu, J. Suzuki, K. Terao, T. Ishida // *Mechanisms of Ageing and Development*. – 2003. – Vol. 124. – N 2. – P. 237-244.
180. Steinert, S. Telomere biology and cellular aging in nonhuman primate cells / S. Steinert, D.M. White, Y. Zou [et al.] // *Experimental Cell Research*. – 2002. – Vol. 272. – N 2. – P. 146-152.
181. Factor-Litvak, P. Leukocyte Telomere Length in Newborns: Implications for the Role of Telomeres in Human Disease / P. Factor-Litvak, E. Susser, K. Kezios [et al.] // *Pediatrics*. – 2016. – Vol. 137. – N 4. – P. e20153927.

182. Bendix, L. Leukocyte Telomere Length and Physical Ability among Danish Twins Age 70+ / L. Bendix, M.M. Gade, P.W. Staun [et al.] // Mechanisms of Ageing and Development. – 2011. – Vol. 132. – N 11-12. – P. 568-572.
183. Lee, W.-W. Age-related telomere length dynamics in peripheral blood mononuclear cells of healthy cynomolgus monkeys measured by Flow FISH / W.-W. Lee, K.-H. Nam, K. Terao, Y. Yoshikawa // Immunology. – 2002. – Vol. 105. – N 4. – P. 458-465.
184. Fick, L.J. Telomere Length Correlates with Life Span of Dog Breeds / L.J. Fick, G.H. Fick, Z. Li [et al.] // Cell Reports. – 2012. – Vol. 2. – N 6. – P. 1530-1536.
185. Friedrich, U. Telomere length in different tissues of elderly patients / U. Friedrich, E. Griese, M. Schwab // Mechanisms of Ageing and Development. – 2000. – Vol. 119. – N 3. – P. 89-99.
186. Halliwell, B. Free Radicals in Biology and Medicine / B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge. // Oxford University Press, 2015. – P. 199-283.
187. Seitz, H.K. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis / H.K. Seitz, F. Stickel // Nature Reviews. Cancer. – 2007. – Vol. 7. – N 8. – P. 599-612.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ 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., N.5., 2024. С. 656.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность своему научному руководителю Панченко Андрею Владимировичу за постоянное внимание к работе, ценные советы и неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертации, а также за доверие, поддержку и определяющую роль в моем становлении как ученого.

Искренне благодарю заведующего лабораторией Агумава Аслана Анзоровича за предоставленные условия для проведения исследования и конструктивные замечания.

Особую благодарность выражаю коллегам по лаборатории Павловой Лауре Евгеньевне и Киргинцеву Роману Михайловичу за предоставленные данные, помощь в проведении экспериментов, плодотворные обсуждения и доброжелательную атмосферу в коллективе.

Благодарю за помощь в выполнении ультразвуковой диагностики член-корр. РАН Рощевскую Ирину Михайловну и врача ультразвуковой диагностики Ионову Екатерину Олеговну.