

*А. В. Копытов<sup>1</sup>, Л. П. Титов<sup>2</sup>, К. И. Павлов<sup>2</sup>*

## **ВОЗМОЖНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К РАННЕМУ АЛКОГОЛИЗМУ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ДНК-БИОЧИПОВ**

*РНПЦ психического здоровья<sup>1</sup>,  
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии<sup>2</sup>*

---

*Представлены возможности технологии ДНК-биочипов для исследования предрасположенности к формированию раннего синдрома зависимости от алкоголя. Суммированы подходы по верификации данных, получаемых при исследовании транскриптома пациентов. Показаны возможности использования клеток периферической крови для скринингового ДНК-биочипирования и поиска новых мишеней лекарственного воздействия при синдроме зависимости от алкоголя.*

**Ключевые слова:** *ДНК-биочипы, синдром зависимости от алкоголя, метаболизм этанола, биоинформатика.*

***A. V. Kopytov, L. P. Titov, K. I. Pavlov***

***RESEARCH OPPORTUNITIES TO EARLY ALCOHOLISM PROGREDIENCE  
DIAGNOSTICS ON THE BASIS OF DNA-MICROARRAY TECHNOLOGY***

## Клинический обзор

*In the article was investigated possibility of DNA-microarray technology for early alcoholism progredience diagnostics. Have been described different approaches for DNA-microarray results verification. Were discussed limits for peripheral blood cell use for alcoholism progredience screening-diagnostic and pharmaco-genetic research.*

**Key words:** DNA-microarray, Alcohol dependence syndrome, ethanol metabolic pathways, bioinformatics.

Синдром зависимости от алкоголя (СЗА) является серьёзной медико-социальной проблемой, причём медицинская составляющая значительно выходит за пределы собственно наркологии [1,2]. Формирование здорового образа жизни и профилактика алкогольной зависимости являются одними из приоритетных направлений в работе Министерства здравоохранения Республики Беларусь. Поиск современных подходов в решении этой проблемы должен составлять содержание работы всех звеньев системы здравоохранения [1,2]. По данным главного нарколога Республики Беларусь на 1 января 2012 года в Республике Беларусь состоят на учете по поводу СЗА 179871 человек. Из них 17489 подростков до 18 лет на диспансерном учете с диагнозом употребление алкоголя с вредными последствиями и 78 с верифицированным диагнозом СЗА [1,2]. Республика Беларусь с 2010 отнесена Всемирной Организацией Здравоохранения к категории стран с «экстремально» высоким потреблением алкоголя. По этому, чрезвычайная роль в борьбе с алкоголизацией населения принадлежит методам ранней профилактики алкогольной зависимости на основе современных технологий, позволяющих проводить ранний и высокоточный скрининг возможных групп риска. Это особенно важно, учитывая мировую тенденцию увеличения роли высокотехнологических методов в структуре диагностических исследований [3].

Известны две группы генов, генетические вариации в которых влияют на риск развития алкоголизма, – гены ферментов, непосредственно метаболизирующих алкоголь (группа алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы), и гены, контролирующие передачу нервного импульса (нейротрансмиссию), поведенческие признаки и особенности характера [4]. Если для генов метаболизма алкоголя достаточно ясны и давно известны связь с потреблением алкоголя и механизмы их влияния, то гены второй группы сейчас активно изучаются во всём мире, в том числе с привлечением ДНК-биочипирования [5, 6]. К этой группе относятся десятки генов, вовлечённых в нейротрансмиссию, – гены рецепторов и транспортеров дофамина, серотонина, норадреналина, гамма-аминомасляной кислоты, опиоидного рецептора, гены ионных каналов и белков, участвующих в образовании синаптических контактов, гены аминокислотного метаболизма [7]. Эти исследования публикуются в журналах с высокими индексами цитируемости и включаются фундаментальные методические издания которые повсеместно используют высококвалифицированные медики и биологи [8].

Технология ДНК-биочипов является основной современной скрининг-методикой поиска любых маркёров предрасположенности (наряду с SNP исследованиями) [9,10,11]. Для ряда патологических состояний созданы стандартизированные диагностические ДНК-чипы для массового скрининга населения [12,13]. Базы данных метаболических путей и доступное биоинформационное ПО позволяют эффективно находить возможные маркёры предрасположенности и оценивать достоверность полученных данных. С 2008 года в ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии» в лаборатории экспериментальной и клинической микробиологии под руководством членкорреспондента НАН Беларуси, профессора Титова Л. П. активно внедряются методы иммунобиочипов и ДНК microarray, как одни из наиболее передовых и бурно развивающихся современных методов геномических исследований. Создан и испы-

тан диагностический чип (eChip) на 652 гена, включающего основные клеточные метаболические и транскрипционные пути, а также ключевые иммунологические генетические маркеры.

**Цель статьи:** провести обзор литературы и Международных биоинформатических баз данных для оценке возможностей и перспектив технологии ДНК-биочипов в скрининг-диагностике предрасположенности к формированию СЗА. Изучить имеющийся технический и методический опыт в этой области. На основе стандартизированных классических подходов разработать наиболее простую и доступную схему исследования транскриптома с помощью ДНК-биочипов.

### Методы.

Для идентификации соответствующих исследований использовалась комбинация ключевых слов: «ДНК-биочипы», «иммобилизованные олигонуклеотиды», «функционализация подложки слайдов», «алкогольная зависимость», «употребление алкоголя с вредными последствиями», «злоупотребление алкоголем», «алкоголь», «хронический алкоголизм», «алкогольная интоксикация», «нормализация уровней флюоресценции», «метаболические сети (networks)», «генные карты».

Произведен поиск электронных баз данных: “Current Contents”, “ЕТОН”, “Medline”, “PsyInfo”, “PubMed” (с 1999 до 2013). Все полученные в ходе исследования статьи относительно на английском языке были сохранены. Проведено сравнение используемых авторами подходов с классическими методиками (согласно *Methods in Molecular Biology series*. Humana Press, a part of Springer Science, 1999-2012. Для изучения метаболических путей использованы следующие базы данных: KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Drug metabolism - cytochrome P450 - Reference pathway section; Pathway Maps - 5. Organismal Systems - 5.6 Nervous system), The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA. Для изучения широты выбора генов кандидатов для диагностического ДНК-чипа использовалась полногеномная матрица (Arrayit\_H25K\_Complete Human Gene list).

### Технология ДНК-биочипов.

ДНК-биочип позволяет одновременно исследовать экспрессию большого количества генов (вплоть до полногеномного исследования). Типичный ДНК-биочип представляет собой прозрачную подложку (часто обычное предметное стекло 1 x 25 x 76 мм), на которой в фиксированных участках иммобилизованы специфические олигонуклеотиды или последовательности кДНК [14]. Отдельный участок, содержащий олигонуклеотиды или последовательности кДНК, комплементарные определённому элементу генома или транскриптома называется «spot» (spot), или пятно. Споты на подложке расположены в рядах по вертикали и горизонтали на равном удалении друг от друга и объединены в блоки. Позиция каждой такой точки отмечена в специальной карте, прилагаемой к чипу производителем. Прикрепление олигонуклеотидов или последовательностей кДНК на стеклянной подложке происходит благодаря взаимодействию с фиксирующим покрытием. Для ДНК-биочипов обычно используются аминные, альдегидные, эпокси- и метакрилатные покрытия к соответствующим группам которых и происходит прикрепление субстрата [14,15] (Рисунок 1).

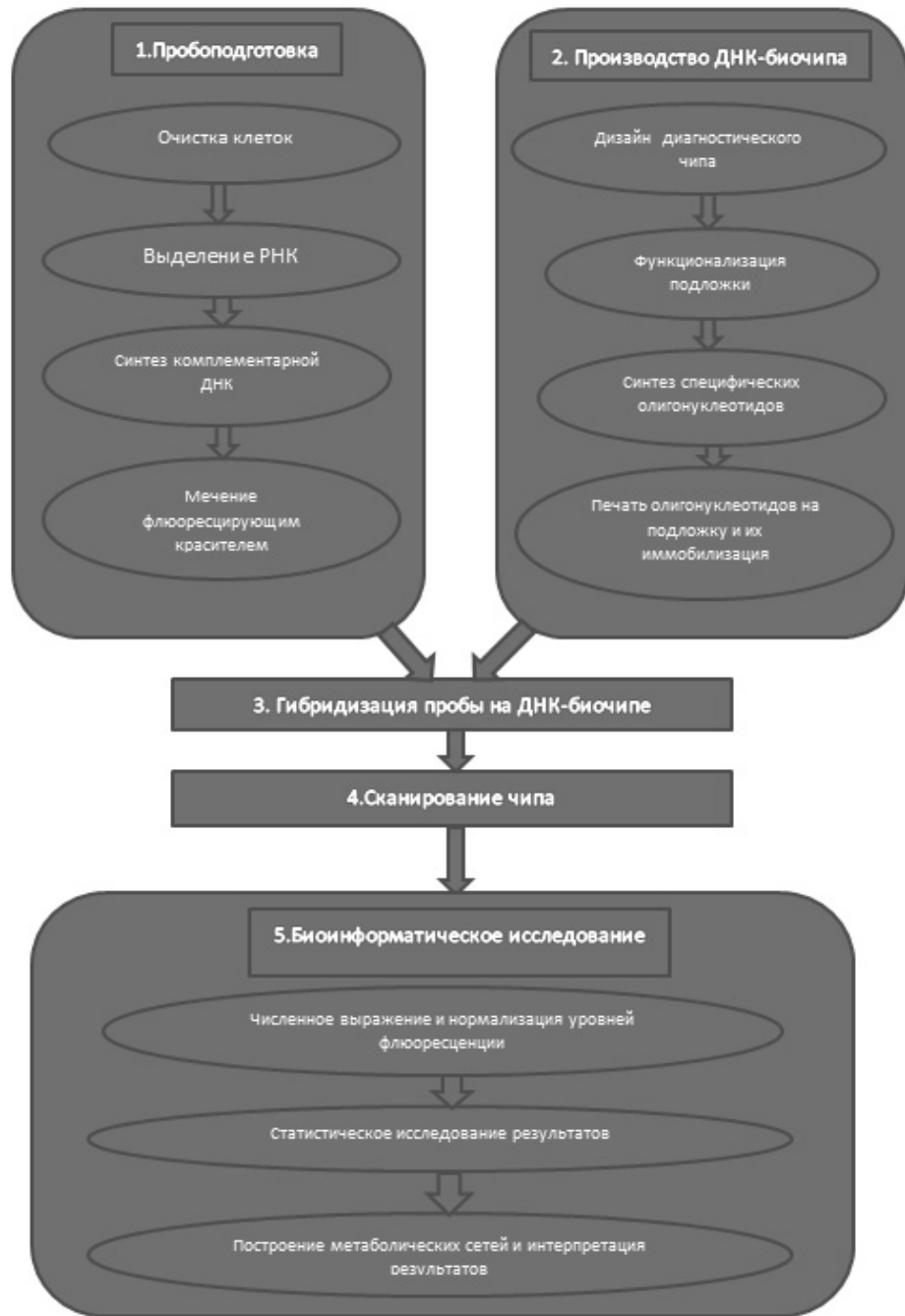
При исследовании профиля экспрессии генов изучается транскриптом, т. е. совокупность матричной РНК популяции клеток. Таким образом удаётся установить какие гены из общей совокупности генома экспрессируются в данных клетках

и, главное, какова численная степень экспрессии каждого из этих генов. Для этого с помощью фермента обратной транскриптазы и стандартного набора праймеров (random primer) к исследуемой мРНК синтезируется комплементарная одноцепочечная ДНК (кДНК). Именно ей соответствуют олигонуклеотиды, иммобилизованные на поверхности ДНК-биочипа [15,16]. Синтезированная кДНК, наряду со стандартными нуклеозидами, содержит аллильные нуклеозиды к которым способны прикрепляться молекулы красителя. Чаще всего для ДНК-биочипов используют пару красителей Су3 и Су5, хотя в последнее время их вытесняют красители группы AlexaFluor [15]. После гибридизации, отмывки непрогибридизовавших участков кДНК, гибридизационных буферов и излишков красителя слайд сканируют. Большинство микроэрей-сканеров имеют два лазера с пиками возбуждения 535 и 635 нм. Соответственно, может происходить учёт флуоресценции по двум каналам. Для красителя Су3 будет характерна экстинкция с пиком 535 нм (зелёное свечение), а для Су5 - экстинкция с пиком 635 нм (красное свечение). Уровни излучения фиксируются и записываются в единицах флуоресценции. Другими важными характеристиками микроэрей-сканеров являются оптическое разрешение, скорость сканирования, чувствительность детекторов [14]. Полученные уровни флуоресценции далее анализируются методами биоинформатики. Основными пакетами программ для биоинформатического анализа данных биочипирования являются MeV, Mayday, R from Bioknonductor, а также непосредственно ПО, входящее в комплект к сканеру [8,14,15].

#### Подходы к верификации и стандартизации результатов ДНК-биочипирования.

Ключевым моментом при исследовании транскриптома является качество полученной РНК. Для этого доставляемые в лабораторию клетки должны отличаться высоким уровнем жизнеспособности, стандартными характеристиками экспрессии поверхностных молекул. Это возможно проверить учитывая на проточном цитофлуориметре захват исследуемыми клетками красителя пропидия йодида и экспрессию ими специфичных поверхностных маркеров при гибридизации с моноклональными антителами [17].

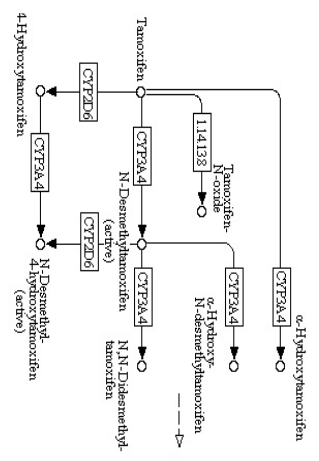
Стандартным методом выделения РНК является фенол-хлороформная экстракция с использованием три-реагента.



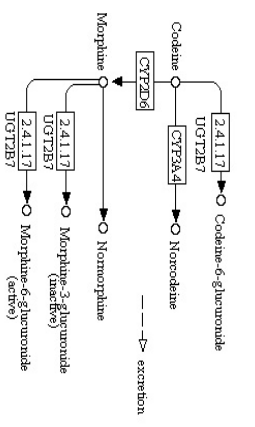
**Рис. 1.** Схема изучения транскриптома с помощью ДНК-биочипов. Под дизайном чипа понимается выбор перечня генов, экспрессия которых исследуется, количество блоков и дублей на каждый спот. Олигонуклеотиды, при этом, могут синтезироваться как на базе полногеномной матрицы, так и в соответствии с известными или возможными аллельными формами генов

Есть также коммерчески доступные наборы, основанные на «горячей» фенольной экстракции. Три-реагент, позволяет выделять больше материала, но при использовании «горячей» фенольной экстракции конечный продукт получается чище, свободнее от примесей из обрывков ДНК и геномной ДНК. Чаще, тем не менее, используют три-реагент) – «горячую» экстракцию применяют реже, она технически более громоздкая, значительно дольше по времени, зато не требует центрифуги с охлаждением [15,16]. Стандартом качества получаемой РНК является денатурирующий агарозный гель-электрофорез с добавлением формальдегида [17]. Возможно также исследова-

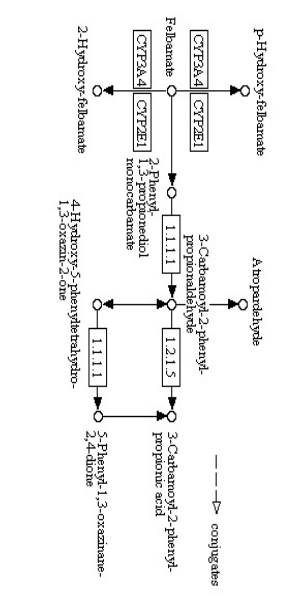
**Tamoxifen**



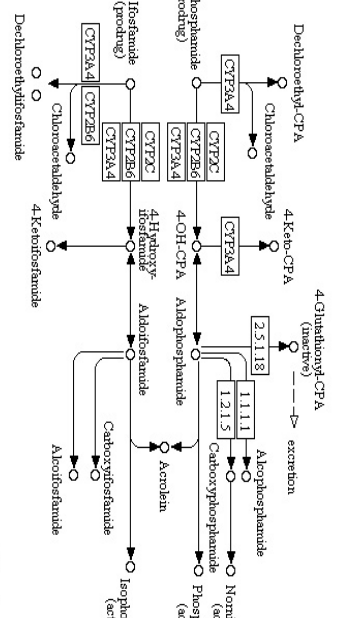
**Codeine & Morphine**



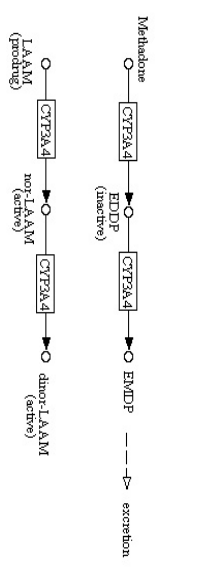
**Fentanyl**



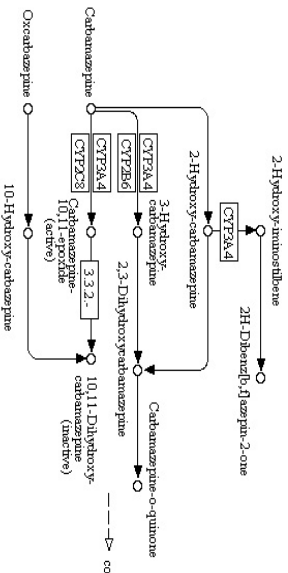
**Cyclosporinamide & Fosfamid**



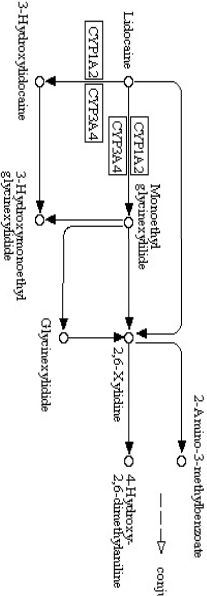
**Methadone**



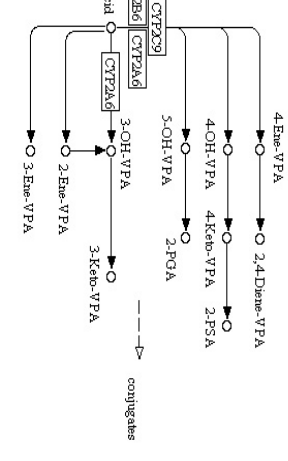
**Carbamazepine & Oxcarbazepine**



**Lidocaine**



**Valproic acid**



**Citalopram**

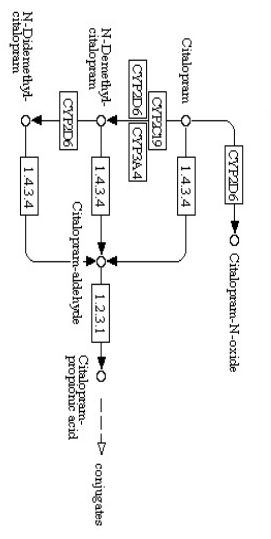


Рис. 2. Фрагмент метаболической карты Цитохрома P450, ответственный за детоксикацию ксенобиотиков печени и важных при гепатотоксических поражениях, вызванных этанолом (Международная база данных KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, верификация по базе данных The Comprehensive Enzyme Information System VRENDA[20,21])

ние содержания РНК по измерению оптической плотности её водного раствора на спектрометре. Считается, что для успешного последующего синтеза кДНК необходимо, как минимум, 10-18 мкг РНК [10].

Для качества синтеза кДНК, её окрашивания и гибридизации используются контроли, содержащие известную РНК. Применяются тестовые ДНК-биочипы, содержащие точки, которые априори не должны светиться, либо последовательности, специфичные для генов «домашнего хозяйства» клетки (housekeeping genes), которые имеют схожие профили свечения в разных типах клеток. Другой метод подтверждения результатов связан с постановкой ПЦР в реальном времени и дальнейшим сравнении результатов экспрессии, полученных двумя разными методами [16].

При исследовании одной популяции клеток возможна также их культивация со специфическими индукторами или митогенами и, наоборот, ингибирующими синтез цитокинов и деление агентами. Далее кДНК двух этих проб окрашивается разными красителями, но гибридизируются они на одном слайде. Далее исследуются сходства и различия в профиле экспрессии генов.

#### Исследование метаболизма этанола с помощью технологии ДНК-биочипов

подавляющее большинство публикаций по применению технологии ДНК-биочипов связано с экспериментальными моделями исследования на животных, в которых исследуется профиль экспрессии генов в нейронах животных получавших этанол перорально, внутрижелудочно либо внутривенно [18]. Эти данные далее экстраполируются на людей. Прижизненное получение нейронов ЦНС у пациентов возможно только при нейрохирургических вмешательствах [5]. Анализ же экспрессии *post mortem* затруднителен, в силу быстрой деградации РНК в мёртвых клетках.

Поэтому, основным источником скринингового материала для страдающих СЗА являются клетки периферической крови. Если для генотипирования, оценки аллельных форм, нуклеотидного полиморфизма подходят любые ядерные клетки, то для оценки профиля экспрессии этого не достаточно, так как в первом случае изучается полногеномная последовательность ДНК, а во втором- только транскрибируемая её часть.

Тем не менее ряд ключевых метаболических путей может быть изучен в том числе и на мононуклеарах периферической крови. Так, открытым является вопрос о количественной роли цитохрома P450 печени в алкогольном метаболизме. Существует предположение о значительном вовлечении данной ферментативной системы в детоксикацию этанола при «перегруженности» алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы. При этом белки подсемейств CYP1A1, 1A2, P1B1, 2A6, 2B6 и, главное, 2E1 имеют схожие профили экспрессии в клетках периферической крови и гепатоцитах [19]. По этому карта метаболического пути цитохрома P450 может быть использована при создании дизайна диагностического чипа (Рисунок 2).

Использование культур клеток для исследования метаболизма этанола связано с рядом моделей исследования первичной культуры кортикальных нейронов, культивации эмбриональных прекурсоров нейронов, исследования гепатотоксичности этанола на культуре клеток HepG2, исследования токсического действия на кишечный эпителий на монослое культуры клеток Caco-2 [22]. Созданы модели, основанные на культивации Купферовских клеток печени, дендритных клеток и натуральных киллеров. Известно также, что гуморальный иммунный ответ при СЗА значительно снижается, что результируется, в первую очередь, в увеличении лёгочной патологии. По этому достаточно широко исследуются популяции В-лимфоцитов и функция антителообразования при хронической интоксикации этанолом.

#### Литература

1. Копытов, А.В., Обьедков В.Г. Популяционная аутентичность синдрома алкогольной зависимости у молодых людей и подростков мужского пола/ Медицинские новости. – 2012, № 5. – с. 69-72.
2. Копытов, А.В., Обьедков В.Г., Голоенко И.М. Результаты первого молекулярно-генетического исследования клинического феномена прогрессивности алкогольной зависимости у подростков и молодых людей мужского пола Республики Беларусь/ Актуальные вопросы диагностики, терапии и реабилитации психических и поведенческих расстройств: материалы международной конференции [на русском, английском языках]/ред. кол. В.А. Снежицкий, В.В. Воробьев, В.В. Зинчук; отв. ред. В.А. Карпук. – Гродно: ГрГМУ, 2012. – 138-141 с.
3. Титов, Л. П. Современные тенденции развития медицинской науки и факторы, способствующие профессиональному росту молодых исследователей/ Л. П. Титов //Здравоохранение. - 2012 - № 7-С. 55-61.
4. Hassan, S. (2003) Pharmacogenomic analysis of mechanisms mediating ethanol regulation of dopamine beta-hydroxylase/ S. Hassan [et al.]/ Biol. Chem. – 2003. – Vol.278. – P. 38860–38869.
5. Lewohl, J. M. Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex/ Lewohl, J. M. [et al.]/ Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2000. – Vol.24. – P. 1873–1882.
6. Mayfield, R. D. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics/ R. D. Mayfield// J. Neurochem. – 2002. – Vol. 81. – P. 802–813.
7. Bailey, S. M. Chronic ethanol consumption alters the glutathione/glutathione peroxidase-1 system and protein oxidation status in rat liver/ Bailey, S. M. [et al.] // Alcohol. Clin. Exp. Res. – 2001. - Vol. 25. - P. 726–733.
8. Laura E. N. Alcohol: Methods and Protocols/ Laura E. N. [et al.]/ Methods in Molecular Biology. – 2008. - Vol. 447. – P. 337-346/
9. Schena, M. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray/ Schena, M. [et al.]/ Science. – 1995. – Vol. 270. – P. 467–470.
10. Pinkel, D. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer/ D. Pinkel, D. G. Albertson// Nat. Genet. – 2005. – Suppl. 37. - S. 11–17.
11. Utilization of microarray platforms in clinical practice/ F. Al-Mulla //Methods Mol Biol. – 2007. – Vol. 382. – P. 115–136.
12. Kallioniemi, A. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors/ Kallioniemi, A. [et al.]/ Science. 1992. – Vol. 258. – P. 818–821.
13. Copland, J.A. The use of DNA microarrays to assess clinical samples: the transition from bedside to bench to bed-side/ J.A. Copland [et al.]/ Recent Prog. Horm. Res. - 2003. – Vol.. 58. – P. 25–53.
14. Arrayit Corporation [Электронный ресурс]. - 2013. - Режим доступа: <http://arrayit.com/> Дата доступа: 26.08.2013
15. Dufva, M. DNA Microarrays for Biomedical Research. Methods and Protocols/ M. Dufva, [et al.]/ Methods in Molecular Biology.- 2009. - Vol. 529. – P. 34-48.
16. Rampal, J.B. DNA Arrays Methods and Protocols Methods and Protocols/ J.B. Rampal [et al.]/Methods in Molecular Biology. – 1999. - Vol. 170. – P. 345-357.
17. Talwar, S. Suffredini Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans/ S. Talwar [et al.]/ Physiol. Genomics. – 2006. – Vol. 25. – P. 203-215..
18. Treadwell, J. A. Microarray analysis of mouse brain gene expression following acute ethanol treatment/ J. A. Treadwell, S. M. Singh //Neurochem. Res. – 2004. - Vol. 29. – Vol. 357–369.
19. Furukawa, M. Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver/ M. Furukawa [et al.]/ Cancer Sci. – 2004. - Vol. 95, №6. - P. 520-529.
20. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes/ [Электронный ресурс]. - 2013. - Режим доступа: (<http://www.genome.jp/kegg/>) Дата доступа: 25.08.2013
21. The Comprehensive Enzyme Information System BRENDA / [Электронный ресурс]. - 2013. - Режим доступа: (<http://www.brenda-enzymes.org/>) Дата доступа: 25.08.2013
22. Sheth, P. Epidermal growth factor prevents acetaldehyde-induced disruption of tight junctions in Caco-2 cell monolayer/ P. Sheth// Alcohol. Clin. Exp. Res. 2004. – Vol. 28. - P. 797–804.

Поступила 5.07.2013