Павлов К.И., Копытов А.В., Титов Л.П.
Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь
Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Минск, Беларусь

Выявление экспрессионных маркеров тяжелых форм течения алкогольной зависимости с помощью технологии ДНК-биочипов (микроэррэй)

Хроническая интоксикация этанолом отражается и на психическом здоровье, и на соматическом состоянии пациента. Среди лиц, страдающих синдромом алкогольной зависимости (САЗ), большинство индивидов имеют семейную наследственность по зависимости от алкоголя [1]. Тем не менее, наличие статических (генотипических) признаков не является достаточным маркером для выявления лиц с предрасположенностью [1, 2]. Однако наличие той или иной низкофункциональной (дефицитной) аллели не гарантирует формирования клинического симптомокомплекса, потому что в патогенезе участвует еще и количественный фактор. Для развития синдрома алкогольной зависимости необходимо формирование ряда физиологических порочных кругов и определенное «накопление», аккумуляция эффекта, которая результируется в стойких метаболических нарушениях. Эти нарушения выражаются в виде стойкого изменения экспрессии ряда генов, связанных с энергетическим метаболизмом, апоптозом и обменом кальция, относящихся к группе генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes), экспрессирующихся на определенном уровне во всех соматических клетках. Прижизненное исследование экспрессии генов структурами ЦНС возможно только при получении остаточного материала после нейрохирургических вмешательств, проводимых по другим поводам. Поэтому основным материалом для экспрессионного анализа являются клетки периферической крови.

Цель исследования: выявить стойкие экспрессионные изменения, возникающие при тяжелых формах алкогольной зависимости, связанные со стойкими изменениями клеточного метаболизма.

Материалы и методы. Дизайн исследования – мультицентровое обсервационное аналитическое кросс-секционное исследование методом «случай – контроль» с направленным подбором групп. Для достижения поставленных целевых задач исследования методом направленного отбора сформирова-

на основная группа (ОГ) из 12 лиц мужского пола, страдающих АЗ (согласно исследовательским критериям МКБ-10 и пороговым значениям по тесту AUDIT≥20 баллов). Субъекты ОГ находились на учете и проходили лечение в ГУ «РНПЦ психического здоровья». Методом направленного отбора по критерию «отсутствие АЗ», на основании пороговых значений по тесту AUDIT<8 баллов, сформирована группа контроля (КГ) из 8 лиц мужского пола, сопоставимая с основной по социально-демографическим характеристикам.

ДНК-микроэррей. Использован диагностический чип Drug Metabolis Arrayit Pathways™ Focused (Arrayit, USA) [3]. Для синтеза кДНК использована РНК мононуклеарных лейкоцитов периферической крови. Синтез кДНК осуществлялся с использованием наборов SuperScript™ Direct plus cDNA Labeling System (Invitrogen) с Alexa-aha-меченым dUTP с последующей преципитацией и Thermo first stand synthesis с использованием амино-аллильных нуклеозидов и колонок для очистки из набора Amino Allyl Fluorescent Labeling Kit. Сканирование чипов проводилось с использованием конфокального сканера Arrayit® InnoScan® 700 (Carbone, Франция) и утилиты Mapix 4,5 [3]. Для статистической и биоинформатической обработки использованы пакеты программ для анализа результатов микроэррей MEV 4.8.1, Expander 6v.

Результаты и обсуждение. Методика ДНК-микроэррей, связанная с исследованием экспрессионной активности, является одним из наиболее реалистичных методов скрининга. ДНК-биочипы позволяют одновременно исследовать экспрессию большого количества генов в зависимости от числа иммобилизованных зондов. Таким образом, понятие «генетический вклад» расшифровывается не только на геномном, но и на транскриптомном уровнях [4].

Формирование алкогольной зависимости на современном этапе рассматривается как сложный мультифакториальный процесс, для формирования которого необходимо сочетание нескольких генотипических и психосоциальных параметров [1]. Тем не менее, используя современные молекулярно-генетические методы, такие как ДНК-микроэррей, становится возможным исследование и патологии с мультифакториальным патогенезом [4]. Центральным звеном в формировании симптомокомплекса тяжелых форм алкогольной зависимости, вызванных аллельными формами с пониженной функциональностью, является возникающий дисбаланс секреции гормонов коры надпочечников (особенно глюкокортикоидов) по типу гиперкортицизма. Возникает клиническая картина хронического стресса, отражающегося в том числе на метаболическом обмене во всем организме, а не только на ЦНС (см. рисунок).

В качестве экспрессионных маркеров формирования тяжелых форм алкогольной зависимости у 10 из 12 пациентов было выявлено стойкое повышение экспрессии 2 генов микросомальной глютатион-трансферазы (microsomal

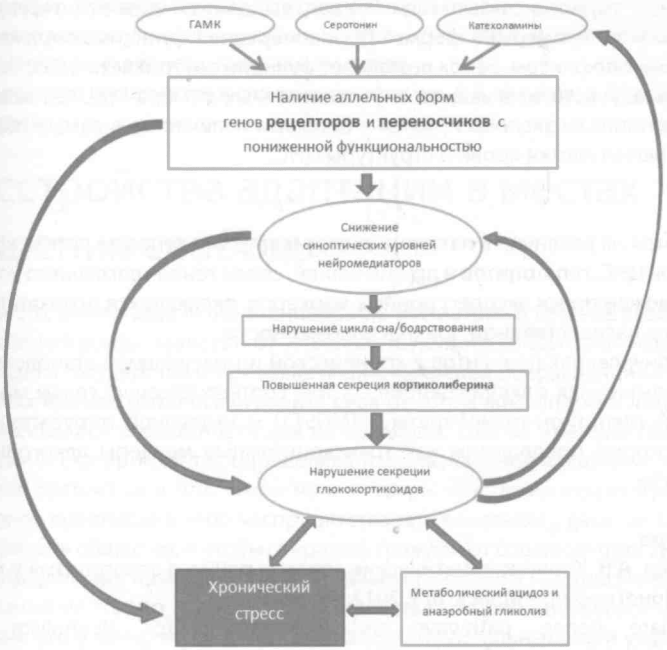

Схема патогенеза синдрома алкогольной зависимости, связанная с наличием низкофункциональных аллелей генов рецепторов и переносчиков нейромедиаторов. Показано, как снижение синоптических уровней нейромедиаторов приводит к нарушению секреции глюкокортикоидов и, как следствие, к отдаленным метаболическим нарушениям в энергетическом метаболизме и гликолизе

glutathione transferase 1 (MGST1)) и мышечной пируваткиназы (muscle pyruvate kinase (PKM2)). В контрольной группе экспрессия данных генов выявлена не была. Microsomal glutathione S-transferase 1 – один из шести протеинов, вовлеченных в метаболизм глютатиона. Белковый продукт локализован на мембранах эндоплазматической сети и митохондрий. Белок катализирует конъюгацию глютатиона и вовлечен в биодеградацию многих токсинов, электрофильных частиц и жирных кислот. Кроме этого, микросомальная глютатион-трансфераза участвует в защите митохондриальной мембраны от продуктов окислительного стресса [5]. Muscle pyruvate kinase, известная также как

цитозольный тириоид-связывающий белок, выполняет множество функций и имеет разные изомерные формы. Первоочередная функция сопряжена с анаэробным гликолизом. Белок выполняет функции внутриклеточного белка-переносчика, участвует в защите внутриклеточных мембран [6]. Ген мышечной пируваткиназы экспрессируется в большом количестве в самых разных тканях, включая клетки крови и структуры ЦНС.

Выводы

Несмотря на различия в паттерне экспрессируемых генов в клетках крови и нейронов ЦНС, гепатоцитов и других тканей, среди генов «домашнего хозяйства» возможен поиск экспрессионных маркеров, являющихся показателями реализации наследственной предрасположенности.

В мононуклеарах пациентов с хронической интоксикацией этанолом выявлена повышенная флюоресценция спотов, соответствующих генам микросомальной глютатион-трансферазы 1 (MGST1) и мышечной пируваткиназы (PKM2), которые предложены как транскриптомные маркеры алкогольной зависимости.

Литература

1. Копытов, А.В. Клинико-генетические аспекты раннего алкоголизма у мужчин. Монография. – Минск: БГУ, 2012. – 400 с.
2. Candidate genes, pathways and mechanisms for alcoholism: an expanded convergent functional genomics approach/ Z. A. Rodd et al.// Pharmacogenomics Journal – 2007. – Vol. 7. – P. 222–256.
3. Arrayit Corporation [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: http://arrayit.com/ Дата доступа: 21.08.2015.
4. DNA Microarray and Proteomic Strategies for Understanding Alcohol Action/ J.M. Sikela et al.// Alcoholism: Clinical & Experimental Research – 2006. – Vol. 30. – P. 700–708.
5. De Jong, J.L. Gene expression of rat and human microsomal glutathione S-transferases./ J.L. DeJong, R. Morgenstern, H. Jörnvall // J. Biol. Chem. – 1988. – Vol. 263. – P. 8430–8436.
6. Dombrauckas, J.D. Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis/ J.D. Dombrauckas, B.D. Santarsiero, A.D. Mesecar // Biochemistry – 2005. – Vol. 44 (27). – P. 9417–9429.