

ПАВЛОВА
Лаура Евгеньевна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ К АЛКОГОЛЬНОЙ ЗАВИСИМОСТИ ЧЕЛОВЕКА У
МАКАК-РЕЗУС (MACACA MULATTA)

06.06.01- биологические науки (Молекулярная биология)

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД

Сочи-2020

**Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»**

**Научный руководитель: член-корреспондент РАН
доктор медицинских наук,
профессор
Имянитов Евгений Наумович**

**Научный консультант: заведующий лабораторией молекулярной биологии
ФГБНУ «НИИ МП»,
кандидат биологических наук
Агумава Аслан Анзорович**

**Рецензент: главный научный сотрудник
лаборатории молекулярной биологии
ФГБНУ «НИИ МП»,
доктор медицинских наук
Панченко Андрей Владимирович**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность темы исследования

Алкоголизм – масштабная проблема, которая не только несет серьезную угрозу жизни отдельных людей, но и является препятствием для социально-экономического развития общества в целом. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, употребление алкоголя является одним из ведущих факторов риска в мире, способным вызвать инвалидность и преждевременную смерть. В результате потребления алкоголя ежегодно умирает 3 миллиона человек, что составляет 5,3% всех случаев смерти, а в возрасте 20-39 лет связаны с алкоголем примерно 13,5% всех смертей [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/alcohol>. Это мультифакториальное заболевание, но общий вклад наследственных факторов в развитие алкогольной зависимости достигает 50-60%.

Несмотря на предложенный специфический молекулярно-генетический профиль (Кибитов и др. 2015), характерный для алкогольной зависимости, литературные данные о вкладе каждого отдельного гена остаются противоречивыми (Reilly et al. 2017). Ведущие предикторные полиморфизмы алкоголизма локализованы в генах, кодирующих ферменты метаболизма алкоголя у человека (Clarke et al. 2016). На молекулярно-генетическом уровне подтверждена также роль нейромедиаторных систем (дофаминовой, опиоидной, серотониновой, ГАМК, глутаматной) в механизмах этиопатогенеза болезней зависимости, включая алкоголизм (Mignogna et al. 2019). На данный момент ассоциированными с развитием алкогольной зависимости у человека считают гены дофаминового рецептора (DRD), β -катенина (KLB), катехол-орто-метилтрансферазы (COMT), μ -опиоидного рецептора (OPRM1), к перспективным относят гены аденорецепторов, транспортера (5-HTT) и рецептора серотонина (HTR2B), рецептора ГАМК (GABRA2) и кортиколиберина (CRHR1), нейропептида Y (NPY), моноаминоксидазы А (MAOA) (Jorgenson et al. 2017; Casey et al. 2015; Malhotra et al. 2016; Francés et al. 2015; Ray et al. 2013; Xu et al. 2013; Tikkanen et al. 2015; Deak et al. 2019). Ряд полиморфизмов, идентифицированных в широкомасштабных геномных исследованиях, хотя и представляют несомненный интерес как потенциальные факторы риска предрасположенности к алкогольной зависимости, к сожалению, ещё не исследовались на предмет их функциональной значимости.

Для перехода к персонализированной медицине очевидна актуальность дальнейшего расширения представлений о наследственных факторах предрасположенности и генетических полиморфизмах, детерминирующих индивидуальные особенности течения заболевания и ответа на фармакокоррекцию. Переход к персонализированной медицине обозначен в Стратегии научно-технологического развития Российской Федерации с 2016 года как приоритетное направление развития на ближайшие 10 – 15 лет. Однако в настоящее время в наркологии подходы фармакогенетики не применяются. Это определяет необходимость исследований в данном направлении на современном этапе, что соответствует стратегии развития персонализированной медицины будущего.

При изучении алкоголизма у людей сложно контролировать влияние средовых факторов, таких как стрессовое воздействие, депривация, социальное положение и другие, а также информация, полученная от лиц, страдающих алкоголизмом, или их родственников, субъективна и может быть недостоверной (Cervera-Juanes et al. 2016). Несмотря на развитие альтернативных методов *in vitro* и *in silico*, центральным звеном в системе доклинического поиска эффективных средств для фармакологической коррекции нарушений, вызываемых хроническим воздействием алкоголя, должна стать батарея экспериментальных моделей, воспроизводящих действие различных средовых и генетических факторов, участвующих в формировании алкоголизма у человека. Приматы могут быть успешно использованы при моделировании алкогольной зависимости, благодаря таким преимуществам, как нейроанатомическое, поведенческое и социальное

сходство с человеком (Barr et al. 2013). Низшие приматы близки к человеку генетически, что важнее всего для исследования. Данные, полученные в исследованиях на обезьянах, могут быть практически полностью транслированы на людей (Карал-оглы. 2019).

Тремя основными научными группами в США под руководством С.С. Barr, К.А. Grant и S.N. Katner ведутся активные работы в области использования лабораторных приматов в качестве модели алкоголизма. По литературным данным, на модели приматов уже была проведена идентификация ряда однонуклеотидных полиморфизмов (Single Nucleotide Polymorphism — SNP) генов CRH (C–248T), NPY (T–1002G), OPRM1 (C77G), полиморфизма числа tandemных повторов (Variable Number of Tandem Repeats –VNTR) гена MAOA и инсерционно-делеционного полиморфизма (Insertions and Deletions – Indel) гена 5-HTT (Barr et al. 2013). Эти гены являются перспективными маркерами предрасположенности к алкогольной зависимости у человека, а в ортологичных генах макак-резус эти полиморфизмы функционально идентичны, и ассоциированы с уровнем потребления алкоголя (Lindell et al. 2010; Barr et al. 2008; Barr et al. 2009).

Настоящее исследование направлено на создание базы для работ в области фармакогенетики алкоголизма. Для этого необходимо изучение генетической структуры популяции обезьян по генам, полиморфизмы которых функционально идентичны ассоциированным с предрасположенностью к алкогольной зависимости у человека. На основании литературных данных, было отобрано шесть таких генов, показавших достоверную ассоциацию с алкогольной зависимостью, однако частота их встречаемости в популяции питомника неизвестна. Таким образом, в настоящее время нельзя судить о возможности использования отечественных лабораторных приматов для исследований в области фармакогенетики алкоголизма.

Все вышесказанное определяет актуальность и возможность поиска и систематизации молекулярно-генетических предикторов алкогольной патологии с использованием лабораторных приматов, а также необходимость дальнейшего расширения представлений о генетических факторах предрасположенности к алкоголизму, что заложит основу для развития персонализированной медицины с использованием отечественных моделей.

Цели и задачи исследования

Цель – исследовать генетическую структуру функциональных полиморфизмов генов систем нейротрансмиссии и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы в популяции приматов питомника и оценить предрасположенность их носителей к алкогольной зависимости с использованием трансляционной модели.

Задачи:

1. Разработать ПЦР тест-системы для определения выбранных на основе научных публикаций полиморфизмов у макак-резус, функционально аналогичных генетическим маркерам развития алкогольной зависимости человека. Оптимизировать ПЦР с конструированными праймерами. Секвенировать продукты амплификации для подтверждения специфичности фрагментов ДНК.

2. Провести молекулярно-генетический скрининг лабораторных приматов, содержащихся в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении "Научно-исследовательский институт медицинской приматологии" (ФГБНУ «НИИ МП») и отобрать животных по полиморфизмам генов, предположительно ассоциированных с риском развития алкоголизма у человека.

3. Воспроизвести трансляционную модель алкоголизма на обезьянах для валидации полученных при молекулярно-генетическом скрининге данных (формирование устойчивой алкогольной мотивации).

4. Провести анализ корреляций полиморфных аллелей исследуемых генов с уровнем потребления этанола.

5. Изучить возможные взаимодействия генных полиморфизмов, показавших наиболее достоверные ассоциации.
6. Разработать систему критериев прогнозирования риска развития алкогольной зависимости на основании изученных полиморфных вариантов генов.

Научная новизна работы

Новизна проекта связана с тем, что впервые проведен генетический скрининг популяции приматов (178 особей) по ряду функциональных полиморфизмов, содержащихся на базе питомника «НИИ МП» в Российской Федерации. Для полиморфизма гена катехол-орто-метилтрансферазы ранее не изучена ассоциация с потреблением этанола у приматов.

В данной работе впервые будет осуществлён систематический анализ известных функциональных полиморфизмов генов системы нейротрансмиссии и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы у большой группы макак-резус (40 особей) с уровнем потребления алкоголя при формировании устойчивой алкогольной мотивации в эксперименте.

Теоретическая и практическая значимость

Одним из основных достижений данной работы является создание банка ДНК-образцов и базы данных о частотах встречаемости исследуемых аллелей среди приматов питомника. Хотя в целом работа носит характер фундаментального исследования, её результаты будут полезны для понимания генетических основ предрасположенности к алкоголизму и востребованы при разработке эффективных подходов фармакокоррекции. Результаты работы имеют значение для идентификации кандидатных полиморфизмов в фармакогенетических исследованиях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Верифицированы и эффективны разработанные тест-системы для идентификации полиморфизмов генов предрасположенности к алкоголизму человека у макак-резус.
2. Для полиморфизмов CRH (C–248T), NPY (T–1002G), OPRM1 (C77G), 5-HTT-LPR закон Харди-Вайнберга соблюдается.
3. В популяции питомника «НИИ МП» SNP гена COMT (1041 T>C) не встречается, все особи являются носителями аллелей дикого типа.
4. Наиболее часто встречается SNP гена NPY (–1002 T>G), доля носителей G аллеля в популяции 62%, а частота встречаемости аллеля 0,6.
5. Из аллелей, ассоциированных с алкогольной зависимостью человека, у макак-резус самая низкая частота встречаемости T аллеля гена CRH (–248 C>T).

Апробация работы

Результаты работы были представлены:

- на V съезде фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств» (14-18 мая 2018 года, г. Ярославль);
- на VIII Международной школе молодых учёных по молекулярной генетике «Генетическая организация и молекулярные механизмы функционирования живых систем» (19-23 ноября 2018 года, г. Звенигород);
- на международной научно-практической конференции «Молодые ученые в медицине и биологии» (18-19 апреля 2019 года, г. Сочи);
- на II Объединенном научном форуме, включающем VI Съезд физиологов СНГ, VI Съезд биохимиков России и IX Российский симпозиум «Белки и пептиды» (1-6 октября 2019 года, г. Сочи);

· в рамках работы XXXII зимней молодежной научной школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", проведенной в Институте биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова (11-14 февраля 2020 года в г. Москва).

По теме научно-квалификационной работы опубликовано 11 научных публикаций, в том числе 4 публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, одна из них в журнале, индексируемом в международной системе цитирования Scopus.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Исследование проводилось на базе лаборатории молекулярной биологии ФГБНУ «НИИ МП», а также лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Все процедуры с животными в исследовании рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией по уходу и использованию животных ФГБНУ «НИИ МП». Все работы с обезьянами проводились в соответствии с требованиями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных целей, ETS № 123 и Директивы №2010/63/EU, принятой Европейским Парламентом 22 сентября 2010 г.

Материалы и методы исследования

Материалы

Материалом для молекулярно-генетического скрининга макак-резус служила ДНК, полученная из лейкоцитов периферической крови здоровых обезьян. Сбор образцов крови для исследования проводился в рамках планового медицинского осмотра обезьян за 2019 год. Для проведения генетического скрининга использовано 178 здоровых самцов макак-резус (*Macaca mulatta*), находящихся на вольерном и клеточном содержании.

Животные

Объектом эксперимента по воспроизведению трансляционной модели алкоголизма (формирование устойчивой алкогольной мотивации) служили 40 клинически здоровых половозрелых самцов макак-резус в возрасте 8-16 лет, содержащихся в питомнике ФГБНУ «НИИ МП» г. Сочи.

Самцы макак-резус отсажены в индивидуальные метаболические клетки (56x55x80см) из нержавеющей стали в изолированную комнату с контролируемым освещением с 6-00 до 18-00 часов, температурой воздуха от 20 до 25 °С и возможностью прекращения подачи питьевой воды. Курс адаптации к условиям пребывания в индивидуальных метаболических клетках и потреблению жидкости из индивидуальной поилки длился 30 дней. Обезьяны получали сбалансированное питание в виде полнорационного гранулированного корма (ФГБНУ «НИИ МП»), а так же дополнительно хлеб, яйца, свежие овощи, фрукты. Водный раствор этанола подавался через специально сконструированные индивидуальные поилки, предотвращающие пролив жидкости. С помощью мерного стакана регистрировался объем потребляемой жидкости.

Выбор полиморфизмов для исследования

Выбор полиморфизмов для исследования осуществлялся на основании литературных данных о влиянии их на функцию гена, в котором они расположены. Достаточным критерием для включения полиморфизма в исследование считалось наличие данных о его функциональности и ассоциации с предрасположенностью к алкогольной зависимости у человека или уровнем потребления алкоголя обезьянами, вне зависимости от того, насколько воспроизводимыми были результаты в ряде опубликованных работ.

Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови проводилось модифицированным гуанидиновым методом с адсорбцией на положительно заряженных частицах оксида кремния, с последующей отмывкой и элюацией (Агумава и др. 2010).

Для идентификации полиморфизмов был выполнен подбор праймеров к геномной последовательности ДНК макак-резус с помощью программного обеспечения Gene Runner (версия 6.5.51. Beta). В качестве консенсусных, использованы геномные последовательности, депонированные в базе данных Ensembl Genome Browser [Электронный ресурс] URL: <https://www.ensembl.org/index.html>. Для проверки специфичности подобранных праймеров использовался интернет портал Primer Blast [Электронный ресурс] URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Синтез праймеров был произведен в лаборатории молекулярной онкологии «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова».

С целью определения оптимальной температуры отжига праймеров была проведена ПЦР в градиенте температур отжига с каждой парой праймеров (55; 55,7; 59; 61,4; 63,3; 64,5; 65,0°C). Генотипирование каждого полиморфизма проводилось следующим методом: при помощи аллель-специфической ПЦР в реальном времени идентифицировали SNP генов CRH (C-248T), NPY (T-1002G), OPRM1 (C77G), COMT (T1041C), либо, в случае VNTR полиморфизма (MAOA-LPR) и Indel-полиморфизма (5-HTT-LPR), при помощи ПЦР-амплификации с последующим анализом полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК (ПДАФ-анализ) в 2% агарозном геле. В таблице 1 представлены нуклеотидные последовательности праймеров, использовавшихся в работе, а также температуры отжига для каждого из анализов.

Для подтверждения специфичности конструированных праймеров полученные продукты амплификации разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном и 2 % агарозном геле. Для подтверждения генотипов, идентифицированных методом аллель-специфической ПЦР дополнительно были подобраны и синтезированы праймеры, охватывающие участки с исследуемыми полиморфизмами. Продукты амплификации с этими праймерами секвенировали в лаборатории молекулярной онкологии «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» с целью подтверждения соответствия генотипов, идентифицированных аллель-специфической ПЦР. Также были секвенированы продукты амплификации с праймерами к участкам генов MAOA и 5-HTT для подтверждения специфичности тестируемого в ПЦР фрагмента ДНК.

VNTR полиморфизм и Indel-полиморфизм анализировались путём ПЦР-амплификации с последующим электрофоретическим разделением фрагментов ДНК в 2% агарозном геле и анализом полиморфизма длины амплифицированных фрагментов ДНК.

Таблица 1– Последовательности общих и аллель-специфических праймеров, использовавшихся в работе, а также температуры отжига для каждого из анализов

Полиморфизм, тип	Метод	Праймеры	Последовательности	Температура отжига
OPRM1 (Arg26Pro) SNP (77C>G)	Аллель-специфическая ПЦР	аллель-специфические праймеры	F: CAAGTTGCTCCCCAGCACG F: CAAGTTGCTCCCCAGCACC	64°C
		общие праймеры	F: AGCAATTGCACTGATGCCTT R: ATGGAGTAGAGGGCCATGAT	
NPY SNP (-1002 T>G)	Аллель-специфическая ПЦР	аллель-специфические праймеры	F: CGCGATGAGCAAATTAATGTG <u>↓</u> F: CGCGATGAGCAAATTAATGT <u>↓</u>	60°C
		общие праймеры	F: TCTTGCATATTCATTCAACAGG R: CCAAAGTGACAGTGGTTAAATG R: AATGAGCAACAGTTTCTCTCTT	
CRH SNP (-248 C>T)	Аллель-специфическая ПЦР	аллель-специфические праймеры	F: ATGGACAAGTCATAAGAAGCC <u>↓</u> F: ATGGACAAGTCATAAGAAGCT <u>↓</u> R: ATTTTGCTATCTCAACACTGAAT	60°C
		общие праймеры	F: GGCCTTTCATAGTAAGAGGTCAATATGT R: CGCCTCTTGGTGACGTCAA	
COMT SNP (1041 T>C)	Аллель-специфическая ПЦР	аллель-специфические праймеры	R: TGCGCACCTTGTCTGCAC R: TGCGCACCTTGTCTGCAT	62°C
		общие праймеры	F: CACCCTGCACAGGCAAGA R: TCAATGAACGTGGTGTGAAC	
MAOA-LPR VNTR (18-нуклеотидный повтор)	ПДАФ анализ	общие праймеры	F: CAGAAACATGAGCACAAACG R: TACGAGGTGTCGTCCAAGTT	63°C
5-HTT-LPR Indel -полиморфизм (21п.н)	ПДАФ анализ	общие праймеры	F: GGC GTTGCCGCTCTGAATGCC R: CAGGGGAGATCCTGGGAGGGA	67°C

Схема опыта по формированию алкогольной мотивации у макак-резус

Формирование алкогольной мотивации (табл. 2) включает 90 дней доступа животных к раствору этанола (сессий) и состоит из 2 этапов. Первый этап – инициация алкогольной мотивации (сессии 1-59). Второй этап - формирование устойчивой алкогольной мотивации (сессии 60-90).

Таблица 2 – Этапы инициации и формирования алкогольной мотивации в зависимости от лимита этанола, концентрации этанола в растворе и длительности доступа к нему

№ блока сессии	Сессии	Концентрация этанола в р-ре (%)	Дни	Лимит этанола (г/кг массы тела)	Длительность доступа к раствору (часы)
Этап инициации алкогольной мотивации					
1.	1-6	1	6	0,5	1
2.	7-11	2	5	0,5	1
3.	12-16	4	5	0,5	1
4.	17-21	4	5	1	1
5.	22-26	4	5	1,5	1
6.	27-31	4	5	2	1
7.	32-59	4	28	ad libitum	1
Этап формирования устойчивой алкогольной мотивации					
8.	60-90#	4	31	ad libitum	24
# - без подсластителя					

Инициация формирования алкогольной мотивации обезьян основана на модифицированной методике, предложенной S.N. Katner с соавторами в 2004 году (Katner et al. 2004; Шмалий и др. 2015). На первом этапе за 1 час до начала эксперимента животным прекращается подача воды. С 10.00 раствор этанола в поилках предоставлялся животным на 1 час. После чего регистрируется количество выпитого раствора, и восстанавливается доступ к воде. Среднесуточное потребление этанола рассчитывается на массу тела. Употребление этанола индуцируется путем постепенного увеличения концентрации (%) и лимита этанола (с 0,5 г/кг до 2 г/кг массы тела животного с 1 по 31 сессии) в ароматизированном подслащенном растворе. В качестве подсластителя используется пищевой концентрат «Yuri» мультифрукт. С 32 сессии животным предоставляется неограниченный доступ к раствору этанола (ad libitum). Продолжительность подачи раствора – 7 дней в неделю.

На этапе формирования устойчивой алкогольной мотивации (сессии 60-90) животным предоставляется свободный выбор между водой и 4% раствором этанола без подсластителя 24 ч/сутки, 7 дней в неделю без ограничения доступа к стандартному корму. Ежедневно в 10.00 регистрируется количество выпитого раствора.

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов генотипирования проводили методами, используемыми при проведении популяционно-генетических исследований. Критический уровень значимости $\alpha=0.05$. Соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга оценивалось при помощи теста Хи-квадрат (Graph Pad Prism 6.0).

Нормальность распределения уровня потребления раствора этанола макаками-резус в опыте по формированию алкогольной мотивации проверяется с помощью критерия Д'Агостино-Пирсона. Так как не все анализируемые переменные имеют распределение близкое к нормальному, статистическая значимость различий определяется

с помощью дисперсионного анализа по тесту Краскела-Уоллиса с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну (Graph Pad Prism 6.0). Полученные результаты выражаются в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Критический уровень значимости $\alpha=0.05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Аналоги полиморфизмов генов, ассоциированных с алкоголизмом человека у приматов

На основании анализа литературы изучаемые полиморфизмы, ассоциированные с алкоголизмом у человека, могут быть разделены на две категории:

- Первая категория включает функциональные полиморфизмы макак-резус в тех же положениях, что ассоциированные с алкоголизмом SNP кодирующей последовательности у человека, но не изученные в отношении потребления этанола приматами. К этой категории отнесён полиморфизм гена катехол-орто-метилтрансферазы (COMT 1041 T>C);

- Вторая категория – функциональные полиморфизмы генов, которые известны в литературе как ассоциированные с потреблением алкоголя у приматов в экспериментах, вне зависимости от локализации в гене (полиморфизмы кортиколиберина (CRH), нейропептида Y (NPY), мю-опиоидного рецептора (OPRM1), моноаминоксидазы (MAOA) и транспортера серотонина (5-НТТ)).

Это деление необходимо учитывать при анализе данных по потреблению алкоголя приматами, так как типичных проявлений алкогольной зависимости в модели на приматах не описано, но имеются данные о значительных различиях уровня потребления этанола.

Результаты разработки, оптимизации и верификации тест-систем

На первом этапе работы проводили конструирование, синтез праймеров и оптимизацию температурного режима амплификации. Далее было проведено электрофоретическое разделение продуктов амплификации исследуемых образцов. В геле отсутствовали продукты неспецифичной амплификации и димеры праймеров. В результате электрофоретической детекции в 10% полиакриамидном (Рис.1.) и в 2% агарозном гелях (Рис.2.) была подтверждена специфичность разработанных тест-систем. Полученные полосы ампликонов соответствовали ожидаемой длине фрагментов (Рис.4). На рисунке 1 и 2, в качестве примера, представлена электрофореграмма продуктов амплификации с разработанными праймерами.

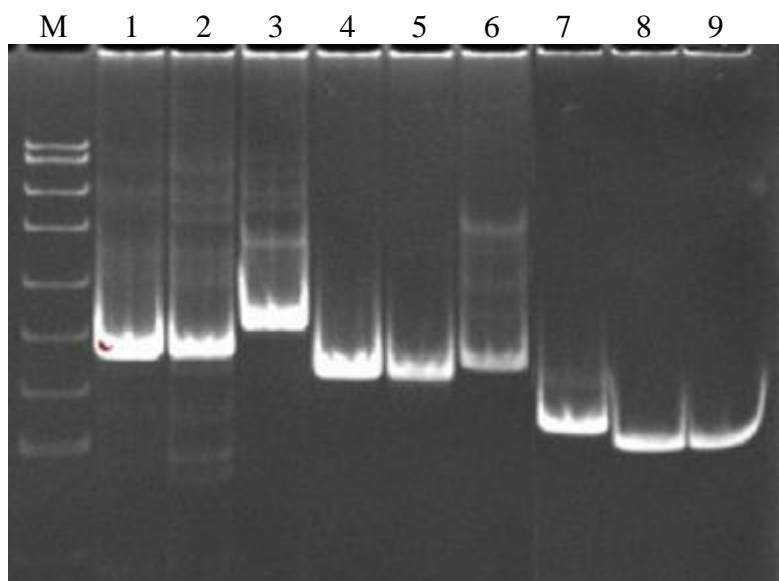


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации аллель-специфической и классической ПЦР с праймерами к SNP генов OPRM1, NPY, CRH. М – маркер

молекулярных масс (сверху вниз: 489, 404, 331, 242, 190, 147, 111 пар нуклеотидных остатков); 1 – 2 – продукт амплификации (178 п.н.) аллель-специфической ПЦР на полиморфизм гена OPRM1; 3 – продукт амплификации (206 п.н.) классической ПЦР с праймерами на участок, охватывающий полиморфизм гена OPRM1; 4 – 5 – продукт амплификации (149 п.н.) аллель-специфической ПЦР на полиморфизм гена NPY; 6 – продукт амплификации (158 п.н.) классической ПЦР с праймерами на участок, охватывающий полиморфизм гена NPY; 7 – продукт амплификации (124 п.н.) классической ПЦР с праймерами на участок, охватывающий полиморфизм гена CRH; 8 – 9 – продукт амплификации (112 п.н.) аллель-специфической ПЦР с праймерами на участок, охватывающий полиморфизм гена CRH

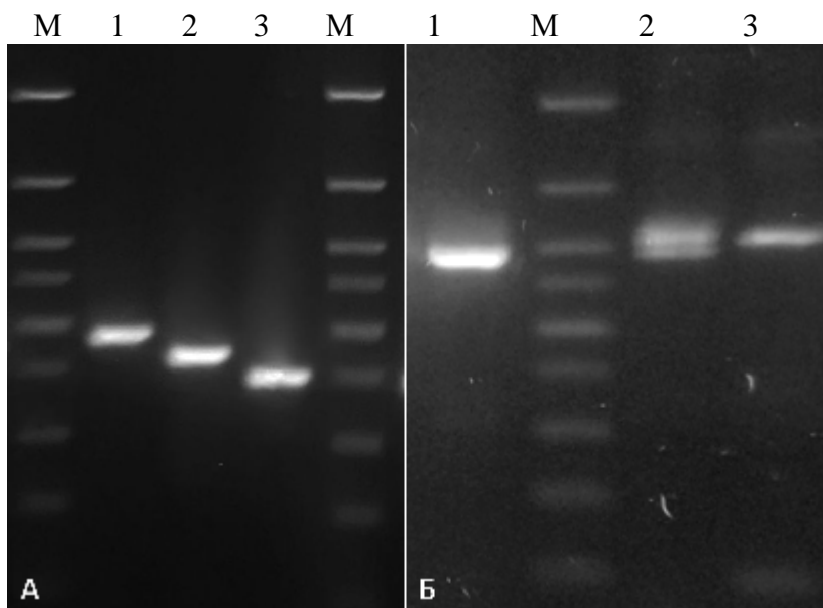


Рисунок 2 – Электрофореграмма анализа полиморфизма длин амплифицированных фрагментов по генам MAOA и 5-HTT. А – продукты амплификации с праймерами к MAOA-LPR. М – маркер молекулярных масс (сверху вниз: 700, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150 п.н.); 1 – гемизигота, содержащая 7 повторов (282 п.н.); 2 – гемизигота, содержащая 6 повторов (264 п.н.); 3 – гемизигота, содержащая 5 повторов (246 п.н.), Б – продукты амплификации с праймерами к 5-HTT-LPR. 1 – гомозиготный (s/s) генотип 399 п.н.; М – маркер молекулярных масс (сверху вниз: 700, 500, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 п.н.); 2 – гетерозиготный (s/l) генотип; 3 – гомозиготный (l/l) генотип (420 п.н.)

Результат сервенирования продуктов амплификации с праймерами, охватывающими участки с исследованными полиморфизмами, подтвердил специфичность разработанных тест-систем. Данные, полученные при секвенировании, соответствовали генотипам, идентифицированным аллель-специфической ПЦР и ПЦР с ПДАФ анализом.

В качестве примера, на рисунке 3 представлен результат идентификации полиморфизма (–248 С>Т) гена CRH методом аллель-специфической ПЦР. Для образца № 36799 (рисунок 3А) эффективна амплификация с праймерами к С аллели, животное гомозиготно по С аллели гена CRH. Для образца №37092 (рисунок 3Б) эффективность амплификации равна как для С, так и для Т специфичных праймеров, следовательно животное гетерозиготного по полиморфизму (–248 С>Т) гена CRH.

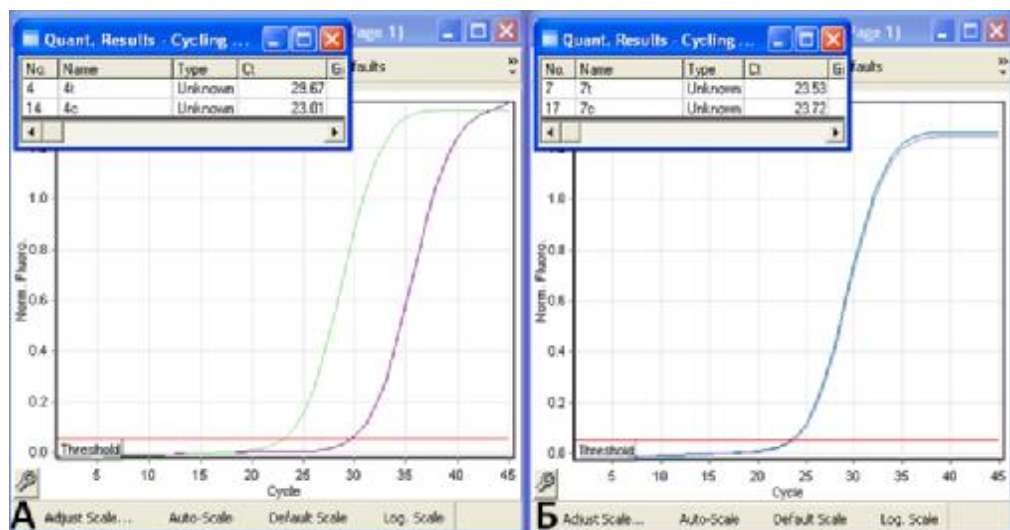


Рисунок 3 – Результат аллель-специфической ПЦР на SNP гена CRH (-248 C>T) у животных № 36799 и № 37092. А – гомозигота C/C (образец № 36799); Б – гетерозигота T/C (образец № 37092)

Результаты генотипирования

На наличие молекулярно-генетических полиморфизмов нами было исследовано 178 образцов крови самцов макак-резус, содержащихся в питомнике «НИИ МП». В таблице 4 представлены обобщенные данные, полученные при генетическом скрининге.

Таблица 4 – Результаты генотипирования 178 самцов макак-резус по шести полиморфизмам генов OPRM1, CRH, NPY, COMT, MAOA, 5-HTT

Ген, полиморфизм	Генотип	Кол-во случаев	Частота встречаемости	Частоты аллелей		
				C : 0,82		G ^a : 0,18
OPRM1 SNP (77 C>G)	C/C	124	70 %	C : 0,82 G ^a : 0,18		
	C/G ^a	44	25 %			
	G/G ^a	10	6 %			
CRH SNP (-248 C>T)	C/C	166	93%	C : 0,96 T ^a : 0,04		
	C/T ^a	11	6 %			
	T/T ^a	1	1%			
NPY SNP (-1002 T>G)	G/G ^a	32	18 %	T : 0,4 G ^a : 0,6		
	T/G ^a	79	44 %			
	T/T	67	38 %			
COMT SNP (1041 T>C)	C/C	0	0%	T ^a : 1 C : 0		
	C/T	0	0%			
	T/T ^a	178	100%			
MAOA-LPR18- нуклеотидный повтор	5	38	21 %	5 повт: 0,21	6 повт: 0,48	7 ^a повт: 0,3
	6	86	48 %			
	7 ^a	54	30 %			
5-HTT-LPR Indel- полиморфизм 21п.н	S/S ^a	21	12 %	L : 0,67 S ^a : 0,33		
	L/S ^a	77	43 %			
	L/L	80	45 %			

^a – генотипы, ассоциированные, по литературным данным, с большим потреблением этанола макаками-резус в эксперименте

Как следует из данных, представленных в таблице 4, в обследованной популяции SNP гена COMT (1041 T>C) не встречался, то есть все особи являлись носителями аллелей дикого типа. Наиболее часто встречающимся оказался SNP гена NPY (-1002 T>G), доля носителей G аллеля в популяции составила 62%, а частота встречаемости аллеля – 0,6.

Соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга

Первым этапом анализа полученных генетических данных стала проверка соответствия распределения генотипов закону Харди-Вайнберга (таблица 5), что является тестом случайности спаривания в популяции, хотя на практике он используется в качестве проверки контроля качества генотипирования. Оказалось, что для всех изученных полиморфизмов закон Харди-Вайнберга соблюдается ($p > 0,05$), поскольку нет статистически значимых различий между наблюдаемыми и ожидаемыми генотипами.

Таблица 5 – Соответствие распределения генотипов закону Харди-Вайнберга.

Ген, полиморфизм	Генотип	Наблюдаемые	Ожидаемые	Значение p по критерию χ^2
OPRM1 SNP (77 C>G)	C/C	124	120	0,39
	C/G ^a	44	53	
	G/G ^a	10	6	
CRH SNP (-248 C>T)	C/C	166	165	0,56
	C/T ^a	11	13	
	T/T ^a	1	0	
NPY SNP (-1002 T>G)	G/G ^a	32	64	0,78
	T/G ^a	79	86	
	T/T	67	29	
COMT SNP (1041 T>C)*	C/C	0	0	-
	C/T	0	0	
	T/T*	178	178	
MAOA-LPR18- нуклеотидный повтор**	5	38	-	-
	6	86	-	
	7 ^a	54	-	
5-HTT-LPR Indel- полиморфизм 21 п.н	S/S ^a	21	20	0,97
	L/S ^a	77	79	
	L/L	80	79	

* – в данном случае определить различия по критерию χ^2 не возможно.

** – в данном случае анализ ожидаемой частоты и значения p не проводили, вследствие отсутствия данных о генотипе самок, а данный ген локализован в X хромосоме.

^a – генотипы, ассоциированные, по литературным данным, с бóльшим потреблением этанола макаками-резус в эксперименте.

Результаты предварительного эксперимента по воспроизведению алкогольной зависимости у приматов

Предварительный эксперимент был проведен на 6 животных с целью апробации модели алкоголизма у приматов. Формирование алкогольной мотивации у макак-резус состояло из 537 дней доступа животных к раствору этанола (сессий) и включало этап инициации алкогольной мотивации (сессии 1-161) и этап формирования устойчивой алкогольной мотивации (сессии 162-537). Среди данных 6 животных был проведен анализ методом аллель-специфической ПЦР и ПЦР с ПДАФ анализом для идентификации изученных полиморфизмов, результаты которого представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Показатели среднего потребления этанола макаками-резус и их генотипы по исследованным генам

№ животных	36799 (1)	37092 (2)	37171 (3)	38294 (4)	38339 (5)	38248 (6)
Генотип CRH	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	T/C ^a
Генотип NPY	T/G ^a	T/T	T/G ^a	T/G ^a	T/T	T/T
Генотип OPRM1	C/C	C/G ^a	C/C	C/G ^a	C/C	C/C
Генотип MAOA	7 ^a	7 ^a	5	7 ^a	5	6
Генотип 5-HTT	L/L	L/L	L/S ^a	L/L	L/L	S/S ^a
Среднее потребление этанола на этапе инициации, г/кг/сут	0,19±0,03	0,73±0,04	0,72±0,03	0,44±0,04	0,70±0,5	0,96±0,05
Среднее потребление этанола на этапе сформированной мотивации, г/кг/сут	0,21±0,02	0,31±0,02	0,72±0,04	0,36±0,02	3,85±0,09	0,59±0,04

^a – генотипы, ассоциированные, по литературным данным, с бóльшим потреблением этанола макаками-резус в эксперименте

На основании данных, представленных в таблице 6, мы можем сказать, что наибольшее потребление этанола было выявлено у животного № 38339, но полиморфизмов, ассоциированных, по литературным данным, с бóльшим потреблением этанола макаками-резус в эксперименте у него не обнаружено. Высокий уровень потребления показало животное № 37171, носитель полиморфизмов генов NPY и 5-HTT, и животное № 38248 – носитель полиморфизмов генов CRH и 5-HTT. Несмотря на то, что для носителей мутантной аллели гена 5-HTT характерен более высокий уровень потребления этанола, гомозиготная по S аллели особь не показала бóльшее потребление, чем гетерозиготная. Частота мутантной аллели составила 0,33, чем обусловлена низкая вероятность выраженного влияния этого полиморфизма на потребление этанола.

Поскольку животных в предварительном эксперименте не достаточно, чтобы однозначно судить о роли генетических факторов, влияющих на потребление этанола, очевидна необходимость проведения эксперимента с большей выборкой.

Характеристика животных, отобранных в опытные группы основного эксперимента по воспроизведению алкогольной зависимости у приматов

Стратификацию самцов макак-резус проводили на основе результатов генетического скрининга. Для формирования групп было выбрано два из исследованных генов, влияние которых по литературным данным показало наименьшую зависимость от средовых факторов. Было принято решение изучить влияние эпистатического взаимодействия генов и различие влияния гомо- и гетерозиготного состояния OPRM1 на уровень потребления этанола макаками-резус. 40 зрелых самцов макак-резус разделили на 5 групп (n=8) (Табл.7). Группа «OPRM1 гетерозигота» состоит из носителей G аллеля гена OPRM1 в гетерозиготном состоянии, «OPRM1 гомозигота» – носители G аллеля гена OPRM1 в гомозиготном состоянии. Носители низкоактивного аллеля гена моноаминоксидазы – группа «MAOA», группа «OPRM1+MAOA» – носители G аллеля гена OPRM1 в гетозиготном состоянии и низкоактивного аллеля гена моноаминоксидазы. Животные пятой группы «Контроль» не являются носителями аллелей, ассоциированных, по литературным данным, с бóльшим потреблением этанола макаками-резус в эксперименте.

Таблица 7 – Возрастная характеристика отобранных в опытные группы самцов макак-резус с различными полиморфизмами

Название группы		OPRM1 гетерозигота	OPRM1 гомозигота	MAOA	OPRM1+ MAOA	Контроль
Всего (n)	40	8	8	8	8	8
Возраст, медиана (год)	12,2	12,1	13,4	13,6	13,1	12,1
Возраст, диапазон (год)	8,1-16,0	8,2-14,0	8,1-16,0	9,4-15,1	9,0-14,2	8,2-15,0

ВЫВОДЫ

Проведен скрининг генетических маркеров предрасположенности к формированию алкогольной мотивации у лабораторных приматов.

Проделанная работа по генотипированию макак-резус (*Macaca mulatta*) по полиморфизмам генов OPRM1, NPY и CRH и MAOA подтверждает наличие данных полиморфизмов в популяции питомника обезьян ФГБНУ «НИИ МП». В том числе получены данные о распределении частот встречаемости исследуемых аллелей в популяции. Создан банк ДНК-образцов и база данных о частотах встречаемости исследуемых генетических полиморфизмов среди макак-резус питомника.

Полученные данные позволяют использовать отечественных лабораторных приматов для исследований в области фармакогенетики алкоголизма. Такие исследования перспективны и предоставляют уникальную возможность для создания трансляционных моделей болезней зависимости с учетом молекулярных и фармакологических аспектов значения этих полиморфизмов у человека.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ НАУЧНО КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ

1. Павлова Л.Е., Тимина М.Ф., Панченко А.В., Агумава А.А., Янус Г.А., Имянитов Е.Н. Разработка метода идентификации VNTR полиморфизма гена MAOA макак-резусов. В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии Сборник тезисов XXXII Зимней молодежной научной школы. 2020. С. 26.1.
2. Тимина М.Ф., Панченко А.В., Павлова Л.Е., Агумава А.А., Лапин Б.А. Достоверность детекции у людей вируса *macaca mulatta polyomavirus 1* методом ПЦР // В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии Сборник тезисов XXXII Зимней молодежной научной школы. - 2020. - С. 177.
3. Пирожок А.В., Тимина М.Ф., Панченко А.В., Павлова Л.Е., Агумава А.А. Разработка ПЦР тест-системы для определения уровня экспрессии теломеразы в клетках макак-резусов // В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии Сборник тезисов XXXII Зимней молодежной научной школы. 2020. С. 171.
4. Shmaliy A.V., Pavlova L.E., Chuguev Y.P., Lapin B.A., Kolik L.G., Seredenin S.B., Kovalenko V.V. Formation of alcohol motivation in monkeys (*macaca mulatta*) kept in isolation // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019. Т. 167. № 4. С. 516-520
5. Павлова Л.Е., Тимина М.Ф., Шмалий А.В., Янус Г.А., Имянитов Е.Н. Генотипирование макак резус (*Macaca mulatta*) адлерского приматологического центра по полиморфизму гена OPRM1 // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2019. - Т. 37. - № 5. - С. 41.
6. Тимина М.Ф., Шмалий А.В., Павлова Л.Е., Агумава А.А. Разработка и оптимизация тест-системы ПЦР с гибридационно-флуоресцентным методом детекции для обнаружения парвовируса в лабораторной диагностике // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019. Т. 37. № 5. С. 48.

7. Павлова Л.Е., Панченко А.В., Агумава А.А., Янус Г.А., Имянитов Е.Н. Генотипирование макак резус (*macaca mulatta*) адлерского приматологического центра по полиморфизму гена CRH // В сборнике: Молодые ученые в медицине и биологии Международная научно-практическая конференция. 18-19 апреля 2019 год, г. Сочи. Электронный ресурс. - 2019. - С. 129-135.
8. Павлова Л.Е., Тимина М.Ф., Панченко А.В., Агумава А.А., Янус Г.А., Имянитов Е.Н. Генотипирование макак резус по полиморфизму гена NPY // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2019. № S1. С. 186.
9. Тимина М.Ф., Панченко А.В., Павлова Л.Е., Агумава А.А. Разработка экспериментальной rt-PCR тест-системы для детекции вируса панлейкопении кошек и парвовируса собак // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2019. Т. 11. № S2. С. 228.
10. **Шмалий А.В., Павлова Л.Е., Чугуев Ю.П., Коваленко В.В., Федорченко В.И., Лапин Б.А. Особенности формирования алкогольной мотивации при 23-х месячном потреблении этанола макаками резус // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2018. - Т. 81. - № S. - С. 272-273.**
11. Шмалий А.В., Павлова Л.Е., Колик Л.Г., Коваленко В.В., Середенин С.Б., Лапин Б.А. Оценка характера формирования алкогольной мотивации у обезьян (*Macaca mulatta*) при изолированном содержании // В сборнике: Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии материалы третьей международной научной конференции. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии». 2016. С. 43-54.