

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Е.Н. Бычков, В.Б. Бородулин, Ю.Б. Барыльник, Н.В. Филиппова

ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет
им. В.И.Разумовского» Минздрава России

Фармакогенетика – наука о генетически обусловленной индивидуальной реакции организма на лекарственные средства. Ее основные концептуальные положения базируются на принципах генетического разнообразия человека, связанных с наличием генетического полиморфизма. В зависимости от индивидуальных особенностей генома различные индивиды могут сохранять устойчивость или, наоборот, обнаруживать повышенную чувствительность к повреждающим агентам и лекарственным препаратам [1]. Большинство ксенобиотиков, попадая в организм, не оказывают прямого биологического эффекта и подвергаются различным превращениям, так называемой биотрансформации, то есть серии метаболических реакций, после чего выводятся из организма [3, 5, 9]. Реакции биотрансформации контролируются специальными ферментами системы детоксикации. Наследственные изменения активности таких ферментов и/или несбалансированность в их работе, обусловленные генетическим полиморфизмом, приводят к неадекватной реакции организма на различные ксенобиотики. Следствием этого могут стать нежелательные побочные реакции либо отсутствие терапевтического эффекта при приеме лекарственных средств. Наличие точных данных о химической структуре лекарства, биомеханизме его действия, а также о ферментных системах, контролирующих этот процесс, дополненных сведениями о строении соответствующих генов, способствует быстрому прогрессу фармакогенетики как одному из наиболее перспективных разделов молекулярной медицины. Более того, выявление ассоциаций полиморфных вариантов генов с различной индивидуальной чувствительностью к лекарственным препаратам позволяет не только уточнить патогенез самого заболевания, но и разработать оптимальную стратегию лечения с учетом биохимической индивидуальности пациента [1, 2, 5, 8].

Началом любой клинической симптоматики выступают изменения на молекулярном уровне, которые предшествуют развитию полной картины заболевания. Выявление подобных молекулярных маркеров представляет собой отдельную задачу и зависит от

понимания исследователем конечной цели. Можно говорить о своеобразном «дизайне» или «скелете» проводимых исследований для получения информации о прогрессировании заболевания и ранней диагностики начальных форм той или иной патологии.

Особо следует отметить значение молекулярно-генетических исследований, поскольку многие процессы в организме детерминированы генетически, и для успешного симптоматического лечения наркозависимых пациентов в обязательном порядке необходимо учитывать роль молекулярно-генетического фактора, поскольку биохимические показатели могут отражать метаболические процессы, протекающие в организме лиц, страдающих наркотической зависимостью, и определяемые генетическим фактором [1, 6]. К такого рода процессам можно отнести, в частности, детоксикацию наркотических препаратов, их проникновение в ткани головного мозга и процессы выведения наркотиков из организма [4, 6, 7].

Материалы и методы исследования

В течение пяти лет (с 2007 по 2011 гг.) было обследовано 250 больных, страдавших хронической опийной наркоманией, которая привела к развитию печеночной и почечной патологии, артериальной гипертензии и хронической болезни почек.

Всем пациентам проводилось стандартное клинико-инструментальное обследование. В табл. 1 указано распределение обследованных наркозависимых лиц по поло-возрастным критериям.

Распределение обследованных больных в зависимости от длительности употребления наркотических препаратов представлено в табл. 2.

Таблица 1

Общее число обследованных наркозависимых пациентов

Пол	Возраст					
	18–29 лет		30–49 лет		50–60 лет	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мужчины	102	40,8	63	25,2	39	15,6
Женщины	23	9,2	12	4,8	11	4,4
Итого (n=250)	125	50	75	30	50	20

Общее число пациентов с различным стажем употребления наркотиков

Пол	Стаж употребления наркотиков							
	2–3 лет		4–5 лет		6–8 лет		более 9 лет	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Мужчины	32	12,8	70	28	63	25,2	39	15,6
Женщины	18	7,2	5	2	12	4,8	11	4,4
Итого (n=250)	50	20	75	30	75	30	50	20

Биочипы – массивы ячеек, содержащих различные молекулярные зонды. Биочипы изготовлены методом фотоиндуцируемой совместной полимеризации олигонуклеотидов и компонентов акриламидного геля. Гелевые ячейки микрочипа полусферической формы химически пришиты к твердой поверхности, в каждой ячейке иммобилизованы молекулы зонда одного типа. Зонды нанесены на поверхность микрочипа в определенной последовательности, размер ячеек составляет 150 мкм. Проведение полимеразной цепной реакции осуществлялось в два этапа с добавлением праймеров, специфичных к исследуемым генам. Флуоресцентное мечение ПЦР-продукта проводили на втором этапе ПЦР с помощью красителя пентаметинового ряда. При этом праймер, содержащий флуоресцентную метку, добавляли в ПЦР-смесь в более высокой концентрации, чем немеченый праймер, таким образом, чтобы преимущественно нарабатывалась одна меченая цепь. В процессе дальнейшей гибридизации на биочипе происходило специфическое взаимодействие молекул-зондов и молекулы-мишени по принципу комплементарности. Гибридизационную смесь полностью денатурировали в течение 5 минут при 95°C, охлаждали во льду, наносили на биочип и инкубировали в течение 10–12 часов при 37°C. После завершения инкубации и удаления гибридизационной смеси поверхность биочипа высушивалась сжатым воздухом, проводилась регистрация флуоресцентных сигналов с помощью портативного анализатора, снабженного программным обеспечением Imager (Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Россия). Картина гибридизации представляет собой распределение сигналов флуоресценции, наиболее ярких в точках специфического связывания зонда и мишени. Метод использования ДНК-чипов высокоинформативен, позволяет анализировать до 50 полиморфных вариантов генов с точностью более 99%. Возможность изучения полиморфизмов генов на чипах в ходе исследования предоставлена ООО «Геночип» г.Саратов.

Результаты и обсуждение

1. *Исследование полиморфизма генов MTHFR и NAT2.* Рассмотрим полиморфизмы генов, которые исследовались в данной работе и дадим оценку превращениям наркотических препаратов, которые, скорее всего, про-

исходят в клетках печени при участии продуктов исследованных генов. Продукт гена MTHFR осуществляет обратное превращение морфина в кодеин вследствие процесса метилирования морфина (рис. 1).

Концентрация кодеина и морфина в сочетании с активностью гена MTHFR будут определять превращение наркотических препаратов друг в друга, а, следовательно, и степень наркотического эффекта у различных категорий наркозависимых пациентов. Установлено, что при активном цитохроме CYP2D6 и неактивном продукте гена MTHFR будет происходить образование больших количеств морфина, и наркотический эффект будет достигаться при меньших концентрациях кодеина и морфина. В том случае, если активность цитохрома CYP2D6 снижена, а активность гена MTHFR повышена, то будет происходить обратная реакция, то есть более интенсивно пойдет процесс превращения морфина в кодеин, и наркотический эффект будет снижен.

Подобная ситуация заставит наркозависимого субъекта, с одной стороны, использовать повышенные концентрации кодеина или морфина, а с другой стороны, будет способствовать употреблению таких препаратов как фенobarбитал, которые стимулируют образование белков-цитохромов, в частности, цитохрома CYP2D6.

Превращение героина в морфин проходит поэтапно. На первом этапе образуется 6-моноацетилморфин (6-МAM) за счет деацетилирования одного остатка уксусной кислоты от героина, на втором этапе образуется морфин вследствие деацетилирования второго остатка уксусной кислоты от 6-МAM. На обоих этапах участвуют два типа ферментов: ацетил-гидролазы и ацетил-трансферазы. Возможно протекание и обратного процесса с участием активной формы уксусной кислоты – ацетил-КоА – и фермента ацетил-трансферазы. Данный фермент способен переносить активированный остаток уксусной кислоты на морфин с образованием 6-МAM. Подобная ситуация возможна в двух случаях: во-первых, при наличии достаточных количеств ацетил-КоА, и, во-вторых, при активной форме ацетил-трансферазы,

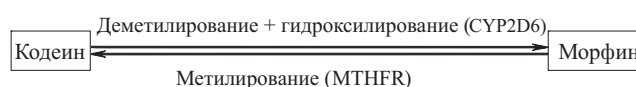


Рис. 1. Схема взаимопревращения морфина и кодеина

которая, в свою очередь, будет определяться полиморфизмом гена NAT2 (рис. 2).

Концентрация ацетил-КоА может быть увеличена при активной работе пируватдегидрогеназного комплекса и сниженной активности цикла Кребса, одной из причин развития которой может быть гипоксия.

В проведенных исследованиях обнаружены следующие распределения полиморфизма генов NAT2 и MTHFR: NAT2 – 70% (Т/Т полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 30%, гетерозиготы Т/С составили 68% и гомозиготы С/С были представлены 2% от всего количества исследованных образцов), NAT2*S1 – 70% (С/С полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 30%, гетерозиготы С/Т составили 68% и гомозиготы Т/Т были представлены 2%), NAT2*S2 – 65% (G/G полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 35%, гетерозиготы G/A составили 58% и гомозиготы A/A были представлены 7% от всего количества исследованных образцов), NAT2*S3 – 0–1% (полиморфизм этого гена был представлен в основном «диким» типом – G/G).

Выявлен полиморфизм гена MTHFR, отвечающего как за превращение морфина в кодеин, так и за образование гомоцистеина: MTHFR – 40% (С/С полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 60%, гетерозиготы С/Т составили 30% и гомозиготы по рецессивному типу – Т/Т – были представлены 10% от всего количества исследованных образцов).

2. *Исследование полиморфизма гена MDR1.* Изучен полиморфизм гена MDR1, который ответствен за синтез гликопротеида Р, который, в свою очередь, встроен в мембрану клеток гематоэнцефалического барьера и клеток энтероцитов и «отвечает» за проникновение гидрофобных и дифильных молекул через гематоэнцефалический барьер, а также через мембрану клеток кишечного эпителия.

Обнаружено, что полиморфизм данного гена составляет 80% (С/С полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 20%, гетерозиготы С/Т – 55% и гомозиготы Т/Т были представлены 25% от всего количества исследованных образцов).

Полиморфизмы С/Т и Т/Т указывают на ослабление функции данного гена и, следовательно, только 20% наркозависимых, имеющих «дикий» тип полиморфизма, могут попасть в группу риска, так как именно у них функция данного гена, скорее всего, не нарушена, и гликопротеин Р, встроенный в мембрану клеток гематоэнцефалического барьера, будет эффективно «выбрасывать» 6-МAM или морфин за пределы ГЭБ, и, следовательно, за пределы головного мозга. Это, в свою очередь, заставляет наркозависимого субъекта увеличивать дозировку наркотического препарата, что в свою очередь может



Рис. 2. Схема превращения героина в морфин

привести к летальному исходу из-за развивающейся гипоксии тканей мозга вследствие угнетения морфином клеток дыхательного центра головного мозга. Кроме того, известно, что морфин способен накапливаться в эритроцитах, провоцируя развитие транспортной гипоксии (рис. 3).

Наркозависимых пациентов с полиморфизмом гена MDR1 по «дикому» типу можно отнести к группе риска по развитию гипоксических состояний и, следовательно, в проводимой терапии необходимо учитывать гипоксический статус пациента и направлять лечение на коррекцию гипоксического состояния у наркозависимых, отнесенных к группе риска.

3. *Исследование полиморфизма генов цитохрома P₄₅₀.* Обнаружен полиморфизм в генах системы детоксикации у наркозависимых пациентов:

CYP2C9*2 – 20% (С/С полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 80%, гетерозиготы С/Т составили 20% и гомозиготы Т/Т были представлены 0–1% от всего количества исследованных образцов);

CYP2C9*3 – 20% (А/А полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 80%, гетерозиготы А/С составили 20% и гомозиготы С/С были представлены 0–1% от всего количества исследованных образцов);

CYP2D6*4 – 30% (G/G полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 70%, гетерозиготы G/A составили 15% и гомозиготы А/А были представлены 15% от всего количества исследованных образцов);

CYP2D6*3 – 0–1% (отсутствие делеции в гене как полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 98%, гетерозиготы с делецией гена составили 0–1% и гомозиготы с делециями в гене по материнской и отцовской хромосомам были представлены 0–1% от всего количества исследованных образцов);

CYP2C19 – 25% (G/G полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 75%, гетерозиготы G/A составили 20% и гомозиготы А/А были представлены 5% от всего количества исследованных образцов);

GSTM1 – 70% (отсутствие делеции в гене как полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 30%, гетерозиготы с делецией гена составили 68% и гомозиготы с делециями в гене по материнской и отцовской хромосомам были представлены 2% от всего количества исследованных образцов);

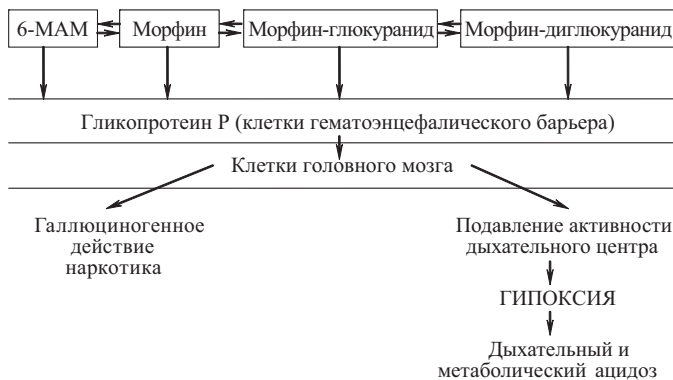


Рис. 3. Схема развития гипоксических состояний у наркозависимых субъектов

CYP1A1 – 35% (wt/wt полиморфизм, т.е. «дикий» тип составил 65%, гетерозиготы 2A/wt составили 25%, гетерозиготы по полиморфизму 2B/wt составили 5% и гомозиготы 2B/2B были представлены 5% от всего количества исследованных образцов).

Заключение

У наркозависимых субъектов прослеживается взаимодействие между печеночной и почечной паренхимой в процессе утилизации наркотиков в печени с последующим их выведением через почки, поэтому состояние генов детоксикации в гепатоцитах, таких как цитохром – CYP-2D6 будет являться одним из индикаторов, указывающих на процессы инактивации наркотических препаратов и их эффективность.

Кроме того, в печени образуется витамин Д₃, который впоследствии поступает в почечную паренхиму

и «дозревает» до кальцитриола. В процессе его образования участвуют ферменты, задействованные в синтезе холестерина и деацелировании наркотических препаратов – полиморфные варианты фермента ацетилтрансферазы NAT-2.

Выявлен полиморфизм гена MTHFR, отвечающего как за превращение морфина в кодеин, так и за метаболизм гомоцистеина.

20% наркозависимых составляют особую группу риска, так как «дикий» тип по аминокислотному составу и высокая плотность гликопротеина Р на мембранах клеток гематоэнцефалического барьера будут тормозить проникновение морфина и героина в клетки головного мозга страдающих наркотической зависимостью пациентов, что в свою очередь потребует увеличения дозы опиатов для достижения наркотического эффекта. Полиморфизм гена MDR1 по «дикому» типу будет способствовать развитию гипоксии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голденкова-Павлова И.В., Брускин С.А., Абдеев Р.М. и соавт. Сравнительный анализ результатов фенотипирования и генотипирования по полиморфизму N-ацетилирования у человека // Генетика: журнал Российской академии наук. 2006. Т. 42, № 8. С. 1143–1150.
2. Минушкина Л.О. Гены ангиотензинпревращающего фермента, NO-синтетазы и эндотелина-1 и гипертрофия миокарда левого желудочка у больных гипертонической болезнью коренных жителей Якутии // Кардиология. 2005. № 1. С. 41–45.
3. Сулейманов С.Ш. Особенности функционирования системы биотрансформации ксенобиотиков в адаптивных реакциях и патологии малочисленных народов Крайнего Севера: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук. 1997. 47 с.
4. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, atherosclerosis and thrombosis // Thromb. Haemost. 1999. Vol. 81. P. 165–176.
5. Hein D.W. Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. / D.W.Hein, M.A.Doll, A.J.Fretland (Eds.). 2000. Vol. 9, N 1. P. 29–42.
6. Heux S., Morin F., Lea R.A. The methylentetrahydrofolate reductase gene variant (C677T) as a risk factor for essential hypertension in Caucasians // Hypertens. Res. 2004. Vol. 27, N 9. P. 663–667.
7. Miyamoto Y., Saito Y., Kajiyama N. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension // Hypertension. 1998. Vol. 32. P. 3–8.
8. Oparil S., Zaman A., Calhoun D.A. Pathogenesis of hypertension // Ann. Intern. Med. 2003. Vol. 139. P. 761–776.
9. Vatsis K.P., Wewber W.W., Bell D.A. Nomenclature for N-acetyltransferases // Pharmacogenetics. 1995. Vol. 5, N 1. P. 1–17.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ НАРКОТИЧЕСКОЙ ЗАВИСИМОСТИ

Е.Н. Бычков, В.Б. Бородулин, Ю.Б. Барыльник, Н.В. Филиппова

Изучение молекулярно-генетических маркеров у наркозависимых субъектов позволит приблизиться к пониманию патологических механизмов, лежащих в основе этого заболевания, и создать в будущем «генетический паспорт» для каждого пациента, страдающего наркотической зависимостью. В статье представлено изучение генетических маркеров 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы, участвующей в метаболизме гомоцистеина и N-ацетилтрансферазы, обеспечивающей процесс превращения

ацетил-коэнзима А в ацетоацетил-коэнзим А, а также генов, участвующих в детоксикации наркотических препаратов. Обнаружены закономерности распределения полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты, участвующие в указанных энзиматических процессах в группе больных наркоманией, что является прологом в исследовании данного патологического процесса.

Ключевые слова: наркомания, метаболические процессы, молекулярно-генетические маркеры.

MOLECULAR-GENETIC ASPECTS OF DRUG ADDICTION

E.N. Bychkov, V.B. Borodoulin, Yu.B. Barylnik, N.V. Filippova

Studying molecular-genetic markers in drug addicts brings us closer to understanding underlying pathological mechanisms and development in the future 'a genetic passport' for every patient. This article reports about studying genetic markers of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase involved in metabolism of homocysteine and n-acetyltransferase and responsible for processing acetyl coenzyme A into acetoacetyl coenzyme A, and also genes

involved in detoxification of narcotic substances. The authors have found regularities in distribution of polymorphic genes frequencies: the ones that code the enzymes involved in mentioned enzymatic processes in drug addicts. The discovery of regularities can be the first step in investigation of this pathological process.

Key words: drug addiction, metabolic process, molecular-genetic markers.

Бычков Евгений Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры психиатрии, наркологии, психотерапии и клинической психологии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И.Разумовского» Минздрава России

Бородулин Владимир Борисович – профессор, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биохимии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им.В.И.Разумовского» Минздрава России

Барыльник Юлия Борисовна – доктор медицинских наук, заведующая кафедрой психиатрии, наркологии, психотерапии и клинической психологии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им.В.И.Разумовского» Минздрава России

Филиппова Наталья Валерьевна – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры психиатрии, наркологии, психотерапии и клинической психологии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им.В.И.Разумовского» Минздрава России; e-mail: natdoc@mail.ru