

УДК 616.89-008.441.13:616.89-008.44133:575:61:34

© А. А. Бабанин, О. В. Беловицкий, К. А. Ефетов, 2010.

VNTR ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ДОФАМИНОВОГО ТРАНСПОРТЕРА И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К АЛКОГОЛЬНО-НАРКОТИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

А. А. Бабанин, О. В. Беловицкий, К. А. Ефетов*

*Кафедра судебной медицины с курсом права (заведующий кафедрой - профессор А. А. Бабанин),
кафедра биохимии (заведующий кафедрой – профессор К. А. Ефетов*),
Государственное учреждение «Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского»,
г. Симферополь.*

VNTR POLYMORPHISM OF DOPAMINE TRANSPORTER GENE AND PREDISPOSITION TO HUMAN ALCOHOL-NARCOTIC INTOXICATION

A. A. Babanin, O. V. Belovitsky, K. A. Efetov

SUMMARY

In human populations, polymorphism of DAT gene in the number of tandem repeats (VNTR) in 3'-not translation area is known. The aim of our study was to determine the relationship between the presence of 9 repeats (VNTR) and alcohol, drug (opioid) and combined alcohol-drug addiction. The study of 49 blood samples of patients with alcoholism and/or drug addiction and the corpses of persons who died out of alcohol, drug or combined intoxications did not reveal a correlation between the presence of 9 repeats (VNTR) in the DAT gene and the frequency of occurrence of alcohol disease or isolated opioids intoxication was not found. However, we discovered the tendency of more frequent occurrence (2.2 times) of combined alcohol-drug intoxication in the presence of 9 repeats (VNTR) in the DAT gene as compared to the cases without 9 repeats (VNTR). According to our data, opioid addiction (also in combination with alcoholism) was found 1.4 times more frequently in individuals with 9 repeats (VNTR) in the DAT gene as compared to the cases in which 9 repeats were absent.

VNTR ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА ДОФАМІНОВОГО ТРАНСПОРТЕРУ І СХИЛЬНІСТЬ ДО АЛКОГОЛЬНО- НАРКОТИЧНОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ У ЛЮДИНИ

А. А. Бабанін, О. В. Біловицький, К. О. Єфетов

РЕЗЮМЕ

У популяціях людини відомий поліморфізм гену DAT за числом тандемних повторів (VNTR) у 3'-області, що не транслюється. Метою нашої роботи було визначення зв'язку між наявністю 9 повторів і алкогольною, наркотичною (опіоїдною) та комбінованою алкогольно-наркотичною залежністю. На матеріалі 49 зразків крові хворих з діагнозом «алкоголізм», «наркоманія» і трупів осіб, які загинули від алкогольної, наркотичної або комбінованої інтоксикації не виявлено залежності між наявністю 9-ти повторів (VNTR) в гені DAT та частотою зустрічаємості алкогольної хвороби або ізольованого вживання опіоїдів. Виявлено тенденцію більш частішої зустрічаємості (у 2,2 рази) комбінованої алкогольно-наркотичної інтоксикації при наявності 9-ти повторів (VNTR) в гені DAT у порівнянні з випадками, коли 9 повторів відсутні. За нашими даними опіоїдна наркоманія (у тому числі і в поєднанні з алкогольною хворобою) зустрічається в 1,4 рази частіше у осіб з 9 повторами (VNTR) в гені DAT, ніж у осіб, які не мають 9 повторів.

Ключевые слова: дофаминовый транспортер, VNTR полиморфизм, полимеразная цепная реакция, алкоголь, наркомания, интоксикация.

Выявление генетической предрасположенности к алкогольной болезни и наркомании является актуальной проблемой в Украине в современных условиях. Это связано с наличием большого количества лиц, употребляющих психоактивные вещества, в частности, алкоголь и наркотики, а также не снижающимся количеством смертей от отравления этими веществами [4, 5, 7]. Из литературы известно, что в

основе формирования зависимости от психоактивных веществ лежат индивидуальные особенности деятельности нейромедиаторных систем и компенсаторные возможности при длительном влиянии этих веществ [2, 10].

К генам-кандидатам предрасположенности к формированию зависимости от психоактивных веществ относятся гены, которые кодируют рецепторы

и ферменты, вовлеченные в метаболизм катехоламинов. Одной из главных систем, отвечающих за формирование зависимости, является дофаминергическая система мозга. Регуляция обмена дофамина имеет решающее значение для психического и физического здоровья человека [1].

Наибольшее количество публикаций посвящено дофаминовому рецептору D2 (DRD2). Его плотность наиболее высока в лимбической системе головного мозга, он играет важную роль в функционировании центральной нервной системы [6]. Однако результаты работ по поиску ассоциаций определенных генов и аддиктивных заболеваний не были столь однозначными.

Поглощение дофамина осуществляется как активный трансмембранный перенос с помощью белкового транспортера. Ген дофаминового транспортера (DAT), картированный на коротком плече хромосомы 5 (5p15.3), может рассматриваться как один из генов предрасположенности к развитию наркоманий.

В популяциях человека описан полиморфизм гена DAT по числу tandemных повторов (VNTR) в 3'-нетранслируемой области. 3'-участок в различных этнических группах может иметь вариабельное число повторов от 6 до 11 при длине мономера 40 пар нуклеотидов. Наиболее частая встречаемость количеств повторов в человеческой популяции – 10.

В доступной нам литературе имеются единичные публикации, носящие фрагментарные и противоречивые данные о наличии полиморфных локусов, в той или иной степени ассоциированных с алкоголизмом и наркоманией [8, 9].

В некоторых работах сообщается, что существует прямая зависимость между 9-тью повторами и развитием наркомании и алкоголизма, другие исследователи эту связь не обнаружили [8, 9]. Несмотря на это, в каталоги ряда научно-исследовательских учреждений и фирм (например, Центра молекулярной генетики РФ) включен набор для ДНК-диагностики данного полиморфизма, и указано, что 9 повторов (VNTR) ассоциированы с алкогольной, никотиновой и наркотической зависимостью.

Учитывая вышеизложенное, целью нашей работы явилось определение связи между наличием 9-ти повторов в 3'-области гена DAT и алкогольной, наркотической (опиоидной) и комбинированной алкогольно-наркотической зависимостью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выполнения поставленной цели нами исследованы 49 образцов крови больных, находящихся на стационарном лечении в КРУ «РНД» (главный врач – Немькин А. В.) с диагнозом «алкоголизм», «наркомания», а также трупов лиц, исследованных в танатологическом отделе КРУ «БСМЭ» (начальник – Морозов И. С.), погибших от алкогольной, наркотической и комбинированной интоксикаций.

Использованы праймеры:

DATVNTRF:

5'-TGTGGTGTAGGGAACGGCCTGAG-3'

DATVNTRR:

5'-CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAGG-3'

Последовательность нуклеотидов данных праймеров была взята из работы Kang A. M. с соавт. [11]. Синтез праймеров был осуществлён в ЗАО «Евроген», г. Москва (заказ № 26-03-08).

ДНК выделялась из образцов крови фенолхлороформным методом с помощью набора для выделения ДНК фирмы Литех (Россия, Москва).

Аmplификация генов проводилась в лаборатории биотехнологии ГУ «КГМУ имени С. И. Георгиевского» (руководитель – проф. Ефетов К. А.) по следующему протоколу: предварительная денатурация 95°C – 2 минуты; 18 циклов полимеразной цепной реакции: денатурация 95°C – 20 секунд, отжиг 60°C – 20 секунд, элонгация 72°C – 20 секунд; финальная элонгация 72°C – 2 минуты.

Использовался амплификатор Mastercycler personal (Eppendorf, Германия). Детекция продуктов амплификации проводилась в 1,5 % агарозном геле в присутствии молекулярных стандартов ДНК – 490 и 424 пар нуклеотидов, при сравнении с которыми выявляли 9 повторов (VNTR) – 438 пар нуклеотидов и 10 повторов (VNTR) – 478 пар нуклеотидов.

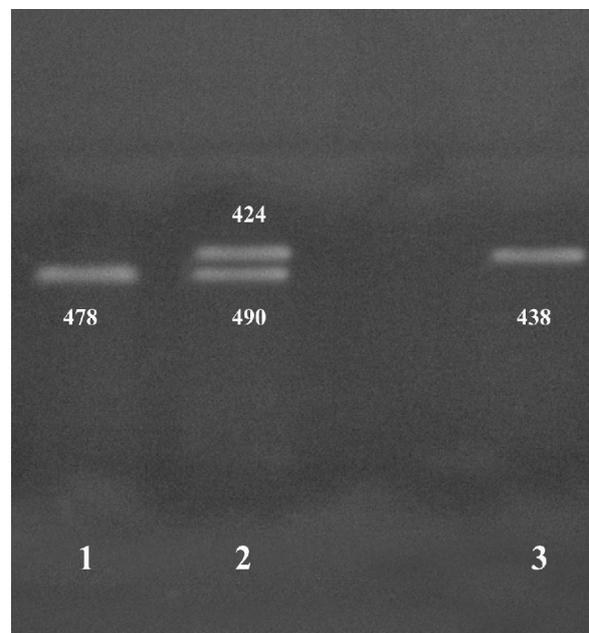


Рис. 1. Электрофореграмма исследуемых ДНК. 1 – образец № 44 (9–); 2 – молекулярные стандарты 490 п.н. и 424 п.н.; 3 – образец № 31 (9+).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования каждого образца крови с помощью вышеупомянутых праймеров были получены амплификаты. Сравняя расположение

электрофоретических фракций амплификатов данного образца крови с расположением на электрофореграмме молекулярных стандартов с известным числом пар нуклеотидов (490 и 424) делался вывод, присутствуют ли в исследованном образце участки ДНК с 438 парами нуклеотидов или отсутствуют.

После проведенного анализа полученных электрофореграмм, показано, что из исследуемых 49 образцов крови в 18-ти случаях обнаружено наличие 9-ти повторов (VNTR) в гене DAT (9+), а в 31-м случае 9 повторов (VNTR) не было выявлено (9-). (таб. 1, рис.1).

Таблица 1.

Наличие 9-ти повторов (VNTR) и алкогольно-наркотической интоксикации у исследованных объектов

№ п/п	Наличие 9 повторов	Алкогольная болезнь	Опиоидная наркомания	Алког. болезнь + Опиоидная н-ия
1	+	-	+	-
2	-	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
5	+	+	-	-
6	-	+	-	-
7	+	+	-	-
8	-	-	+	-
9	-	-	+	-
10	-	+	-	-
11	+	+	-	-
12	-	+	-	-
13	-	+	-	-
14	-	+	+	+
15	-	+	-	-
16	+	+	-	-
17	-	+	+	+
18	-	-	+	-
19	+	+	+	+
20	-	-	+	-
21	+	+	+	+
22	-	+	-	-
23	-	+	-	-
24	-	+	-	-
25	+	+	+	+
26	+	-	+	-
27	+	-	+	-
28	+	+	+	+
29	+	+	-	-
30	-	-	+	-
31	+	+	+	+
32	-	+	-	-
33	+	-	+	-
34	-	+	-	-
35	-	+	-	-
36	-	+	-	-
37	-	+	-	-
38	-	+	-	-
39	+	+	-	-
40	-	+	-	-

Таблица 1. Продолжение

41	+	+	-	-
42	-	+	-	-
43	-	+	-	-
44	-	+	+	+
45	-	+	+	+
46	-	+	-	-
47	-	+	-	-
48	-	-	+	-
49	-	-	+	-

В образцах крови, взятых у больных и трупов лиц, с наличием 9-ти повторов (VNTR) в 77,78% случаев диагностирована алкогольная болезнь. При отсутствии 9-ти повторов (VNTR) алкогольная болезнь встречалась практически с такой же частотой (77,42% случаев). Такое совпадение (таб. 2) говорит о том, что наши данные подтверждают результаты тех исследователей, которые утверждают, что наличие 9-ти повторов (VNTR) не связано с алкогольной болезнью [3].

Кроме того, оказалось, что наличие 9-ти повто-

ров (VNTR) было выявлено в 22,22% случаев при изолированной опиоидной наркомании без употребления спиртных напитков. Подобный процент случаев (22,58%) наблюдался при той же патологии в тех образцах, когда 9 повторов (VNTR) не были выявлены.

Эти данные (таб. 2) также свидетельствуют об отсутствии зависимости частоты встречаемости изолированной опиоидной наркомании от наличия 9-ти повторов (VNTR).

Таблица 2.

Частота встречаемости патологии при наличии и отсутствии 9-ти повторов (VNTR)

Форма патологии	9 (+) [18 образцов]	9 (-) [31 образец]
Алкогольная болезнь (все случаи)	77,78%	77,42%
Опиоидная наркомания (без алкогольной болезни)	22,22%	22,58%
Алкогольная болезнь + опиоидная наркомания	27,78%	12,90%
Опиоидная наркомания (все случаи)	50,00%	35,48%

Однако было выявлено, что комбинированное употребление алкоголя и наркотиков встречается в 2,2 раза чаще у лиц с наличием 9-ти повторов (VNTR) (27,78%) по сравнению с изучаемыми объектами, у которых 9 повторов (VNTR) отсутствовали (12,90%).

Также оказалось, что опиоидная наркомания (все случаи, включая и сочетание с алкогольной болезнью) встречается в 1,4 раза чаще у лиц с 9-тью повторами (VNTR) (50,00%) по сравнению с отсутствием 9-ти повторов (35,48%).

Какой-либо возрастной и гендерной зависимости между исследуемой патологией и 9+ (VNTR) нами обнаружено не было.

ВЫВОДЫ

1. Не обнаружено зависимости между наличием 9-ти повторов (VNTR) в гене DAT и частотой встречаемости алкогольной болезни или изолированного употребления опиоидов.

2. Выявлена тенденция более частой встречаемости (в 2,2 раза) комбинированной алкогольно-наркотической интоксикации при наличии 9-ти повторов (VNTR) в гене DAT по сравнению со случаями, когда 9 повторов (VNTR) отсутствуют.

3. Опиоидная наркомания (в том числе и в сочетании с алкогольной болезнью) встречается в 1,4 раза чаще у лиц с 9-тью повторами (VNTR) в гене DAT, чем у лиц, не имеющих 9-ти повторов.

ПЕРСПЕКТИВА ИССЛЕДОВАНИЙ

В дальнейшем мы планируем провести исследование с привлечением большего количества образцов крови для дальнейшей статистической обработки и определения достоверности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аничков С. В. Нейрофармакология (Руководство). Л., 1982. – 384 с.
2. Анохина И. П. Современные проблемы генетики в зависимости от психоактивных веществ / Анохина И.П., Иванец Н.Н., Шамакина И.Ю., Кибиток А.И., Воскобоева Е. Ю., Хуснутдинова Э. К. // Наркология – 2004. – № 6. – С. 71-77.
3. Анохина И. П. Биологические механизмы зависимости от психоактивных веществ (патогенез) // Лекции по наркологии. – М., 2001. – С. 13-32.
4. Беловицкий О. В. Динамика показателей злоупотребления психоактивными веществами в автономной республике Крым по данным республиканского наркологического диспансера за 7 лет // Таврический медико-биологический вестник. – 2009. – № 3. – С. 123-126.
5. Біловицький О. В. Аналіз випадків смертельних отруєнь психоактивними речовинами в Автономній Республіці Крим // Український судово-медичний вісник. – 2005. – № 2 (18). – С. 33-34.
6. Бочков Н. П. Генетические факторы в этиологии и патогенезе наркоманий (обзор литературы) / Бочков Н. П., Асанов А. Ю., Аксенова М. Г., Новиков А. В., Демидова Н. С. // Наркология – 2003. – № 1. – С. 7-14.
7. Душный В. Я. Наркотики и общество / Душный В.Я., Буряк В. П., Юрченко И. А., Радкевич В. В. // Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. Зб. наукових статей, випуск XX. – Запоріжжя, 2007. – С. 48-52.
8. Сорокина В. В. Генетические маркеры в судебно-медицинской оценке случаев острой и хронической интоксикации опийными наркотиками // Судебно-медицинская экспертиза. – 2010. – № 1. – С. 19-21.
9. Хальчицкий С. Е. Молекулярно-генетические аспекты предрасположенности к возникновению и развитию наркотической зависимости // Адаптивная физическая культура. – 2007. – № 3. – С. 6-15.
10. Юрьев Е. Б. Анализ генетических ассоциаций полиморфного ДНК-локуса D4 гена рецептора дофамина (DRD4) с острым алкогольным психозом и наркоманией в группах разной этнической принадлежности / Юрьев Е.Б., Бердина Л. М., Зайнуллина А. Г., Гайсина Д. А., Фасхутдинова Г. Г., Казанцева А. В., Носкова Т. Г., Хуснутдинова Э. К. // Молекулярная медицина. – 2007. – № 2. – С. 48-51.
11. Kang A. M. Global variation of a 40-bp VNTR in the 3'-untranslated region of the dopamine transporter gene (SLC6A3) / Kang A. M., Palmatier M. A, Kidd K. K. // Biological Psychiatry. – 1999. – V. 46. – P. 151-160.