

Полиморфизм генов дофаминовых рецепторов у больных алкоголизмом и героиновой наркоманией

КИБИТОВ А.О.

к.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики

Национального научного центра наркологии (ННЦН) Минздрава России, Москва

ВОСКОБОЕВА Е.Ю.

к.м.н., в.н.с. лаборатории молекулярной генетики ННЦН Минздрава России, Москва

МОИСЕЕВ И.А.

н.с. лаборатории молекулярной генетики ННЦН Минздрава России, Москва

ШАМАКИНА И.Ю.

к.б.н., в.н.с. лаборатории психофармакологии ННЦН Минздрава России, Москва

АНОХИНА И.П.

д.м.н., профессор, академик РАМН, директор Института медико-биологических проблем наркологии ННЦН Минздрава России, Москва

Анализ данных медицинской генетики говорит о существовании генетической предрасположенности к зависимости от ПАВ, выявление детерминант которой является задачей молекулярно-генетических исследований в наркологии. Нейрохимической основой феномена зависимости от психоактивных веществ (ПАВ) является хроническая дисфункция дофаминовой нейротрансмиттерной системы мозга, в первую очередь затрагивающая систему подкрепления. Клинические проявления зависимости от ПАВ выступают в качестве сверхсложного "мозаичного" фенотипа, определяемого многовариантным взаимодействием генов, прежде всего дофаминовой нейротрансмиттерной системы. В силу своей функциональной роли наибольший интерес в этом плане представляют гены D2 и D4 рецепторов. Целью настоящего ассоциативного исследования стало изучение структуры полиморфных локусов генов дофаминовых рецепторов DRD2 (Taq I Nco I) и DRD4 (48 н.п. VNTR) у больных алкоголизмом (n=252) и героиновой наркоманией (n=326) по сравнению с контрольной группой (n=141). Ген DRD2. У больных алкоголизмом (А) и наркоманией (Н) обнаружено сходное и однонаправленное изменение частот, по сравнению с контролем (К): превалирование частоты А1 аллеля (А — 20,77%, Н — 23,51% (p = 0,018) против К — 16,41%), повышение частот генотипа А1\А2 (А — 31,05% (Pb = 0,058), Н — 39,5% (Pb = 0,0002) против К — 20,6%) и тандемного генотипа по двум локусам (Taq+Nco) (А1\А2, N1\N1): А — 18,95% (Pb = 0,0488), Н — 19,3% (Pb = 0,0006) против К — 9,9%. Ген DRD4. Выявлено значительное снижение частоты кластера аллелей (А2+А3+А8) среди больных: А — 13,5% (Pb = 0,009), Н — 11,5% (Pb = 0,004) против К — 21,6%. Превалирование частоты кластера генотипов (2\7+4\4+4\5+4\7) в группах больных: А — 80% (Pb = 0,023), Н — 85% (Pb = 0,011, OR = 2,41 [1,31; 4,44]), К — 68%. Тот факт, что выявленные детерминанты универсальны для зависимости от разных видов ПАВ (алкоголя и героина в нашем случае) может свидетельствовать о патогенетическом характере "системы" детерминант, вероятно связанных с генетической предрасположенностью к наркологическим заболеваниям.

Введение

Как показывает клиническая практика, больные с отягощенной наследственностью по алкоголизму или наркоманиям — тяжелые, резистентные к терапии, с короткими ремиссиями или вообще без них, течение болезни у таких больных чаще всего высокопрогрессирующее, а прогноз исключительно неблагоприятный [12, 15]. В последних исследованиях было показано, что злоупотребление алкоголем передается по наследству ориентировочно в 38%, в то время как потребление психостимуляторов и опиатов проявило наследственный характер от 11 до 45% [24].

Анализ данных медицинской генетики по изучению характера наследования предрасположенности к зависимости на примере алкоголизма [15, 25, 28] приводит к выявлению сложного типа наследования, не подчиняющегося менделевским принципам, что характерно для так называемых полигенных мультифакториальных заболеваний. Многие авторы говорят о существовании генетической предрасположенности к зависимости от ПАВ [4, 6, 13, 22], выявление признаков которой является важнейшей задачей молекулярной генетики наркологических заболеваний.

Нейрохимической основой феномена зависимости от ПАВ считается хроническая дисфункция дофаминовой нейротрансмиттерной системы мозга, в первую очередь затрагивающая систему подкрепления. Эта гипотеза, впервые выдвинутая И.П. Анохиной [1, 2, 4] для

алкоголизма, сегодня находит свое подтверждение и для других видов зависимости от ПАВ [2, 21, 22]. Многолетние исследования психофармакологии, нейробиологии, а в последнее время и молекулярной генетики зависимости от ПАВ в ННЦ наркологии подтверждают предположение о существовании единого центрального патофизиологического механизма становления и поддержания зависимости от ПАВ на уровне системы подкрепления, детерминированного генетически [1, 2]. Этот процесс, по-видимому, не зависит от конкретного вида ПАВ и обеспечивает глубокие нейрохимические изменения у будущего больного еще до встречи с ПАВ, и определяет биологическую базу собственно предрасположенности [2]. Фактически, клинические проявления зависимости от ПАВ выступают в качестве сверхсложного «мозаичного» фенотипа, вероятно определяемого многовариантным взаимодействием генов, прежде всего дофаминовой нейротрансмиттерной системы. Можно предполагать значительную генотипическую гетерогенность предрасположенности к зависимости от ПАВ, что обуславливает необходимость расширения поиска от одного двух генов-кандидатов к целостной системе генетических детерминант.

Таким образом, наибольший интерес как возможные маркеры зависимости от ПАВ, представляют гены, контролирующие работу дофаминовой системы. Одним

из важнейших звеньев этой нейробиохимической системы считается семейство дофаминовых рецепторов. Нарушения в работе этих рецепторов, в том числе вызванные генетическими факторами, могут быть критическими в формировании и поддержании нейробиохимических нарушений дофаминовой системы мозга в патогенезе зависимости от ПАВ. В силу своей функциональной роли наибольший интерес в этом плане представляют D2 и D4 рецепторы, активно участвующие в регуляции дофаминовой системы. Целью настоящего исследования стало сравнительное изучение структуры полиморфных локусов системы генов дофаминовых рецепторов у больных алкоголизмом и героиновой наркоманией.

Материалы и методы

Группы больных

Группу А (Алкоголизм) составили 252 пациента-мужчины, славянской этнической принадлежности, находившиеся на стационарном лечении в клинике ННЦ наркологии в период 2003–2005 гг. с диагнозом *хронический алкоголизм* 2-й или 3-й стадии. Средний возраст составил 37,5 года. Группу Н (Наркомания) составили 326 пациентов-мужчин, славянской этнической принадлежности, находившиеся на стационарном лечении в клинике ННЦ наркологии в период 2003–2006 гг. с диагнозом *героиновая наркомания*. Средний возраст составил 27,3 года. Пациенты с верифицированной психопатологией (шизофрения, депрессивные расстройства, суицидальные попытки) были исключены из исследования.

Группу К (контрольную) составили 141 мужчины-донора славянской этнической принадлежности (Центр переливания крови, Москва), средний возраст 35,5 года. Участники контрольной группы не изучались с точки зрения диагностики наркоманий и алкоголизма и семейной отягощенности по алкоголизму, в связи с чем состав этой группы мог оказаться гетерогенным.

Генотипирование и ассоциативный метод

Был использован ассоциативный метод изучения полигенных заболеваний, в виде сравнения частот встречаемости тех или иных вариантов полиморфизма гена между группами пациентов с диагностированным

заболеванием, не имеющих родственных связей между собой и группой здоровых лиц. Изучение структуры ДНК с помощью генотипирования позволяет выявить варианты полиморфизма генов у конкретного пациента. Полиморфизм гена — наличие в гене вариативных (полиморфных) участков, структура которых различна в популяции и существует в нескольких вариантах. Изменение частоты встречаемости варианта в изучаемой группе по сравнению с частотой встречаемости в популяции или группе здоровых лиц служит основанием для предположения о вовлечении данного гена в патогенез заболевания.

Генотипирование образцов ДНК пациентов, полученных из венозной крови путем фенол-хлороформной экстракции, проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для изучения был выбран ряд полиморфных локусов, описанный в табл. 1. Часть пациентов удалось генотипировать не по всем локусам. Количество аллелей и генотипов по результатам генотипирования указано в соответствующих таблицах.

Условия ПЦР для генотипирования

DRD2 Taq I.

Система праймеров:

5'- CCA CGG CTG GCC AAG TTG TC-3',

5'- CAC CTT CCT GAG TGT CAT CAA C-3'

УСЛОВИЯ ПЦР: общий объем — 25–50 мкл, $MgCl_2$ = 1,5 мМ, dNTP = 2,5 мМ, праймеры = 250–500 мкМ, Taq-полимераза = 0,5 ед.а, 94°C — 3 мин (94°C — 30 с; 60°C — 30 с; 72°C — 1 мин; 30–35 циклов); 72°C — 3 мин.

ПЦР-ФРАГМЕНТ: A1 — 308 п.н., A2 — 180, 128 п.н.

РЕСТРИКТАЗА: Taq I ($T^{\wedge}CGA$).

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ: 6–8%-ный полиакриламидный гель-электрофорез.

DRD2 Nco I.

Система праймеров:

5'- CAG TGA GAT GGG TGG CTG ATG-3'

5'-GCA GCC ATG GTT AGG AAG GAC-3'

УСЛОВИЯ ПЦР: общий объем — 25–50 мкл, $MgCl_2$ = 2,5 мМ, dNTP = 2,5 мМ, праймеры = 250–500 мкМ, Taq-полимераза = 0,5 ед.а, 94°C — 3 мин; (94°C — 30 с; 60°C — 30 с; 72°C — 1 мин; 30–35 циклов); 72°C — 3 мин.

ПЦР-ФРАГМЕНТ: N1 — 478 п.н., N2 — фрагменты 283, 195 п.н.

Таблица 1

Характеристики изученных полиморфных локусов генов DRD2 и DRD4

Ген	Хромосома	Локализация	Полиморфный локус	Тип полиморфизма	аллели
DRD2	11, 11q23	3'-область гена (C32806T)	Taq I	SNP (замена нуклеотида)	A1-нет сайта узнавания рестриктазы Taq I, A2- есть сайт узнавания
		Экзон 6\7 6/7 H(cat)313H(cac); cat->cac	Nco I	SNP (замена нуклеотида)	N1- нет сайта узнавания рестриктазы Nco I N2- есть сайт узнавания
DRD4	11, 11p15	Экзон 3	VNTR 48 н.п.	VNTR-повторы последовательности из 48 нуклеотидов	Варианты от 2 до 8 повторов, аллели от A2 до A8 по числу повторов

РЕСТРИКТАЗА: Nco I = Bsp19 I (C[^]CATGG).
ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ: 6–8%-ный полиакриламидный гель электрофорез;

DRD4 VNTR 48 н.п.

Система праймеров:

5'- CTG CAG CGC TGG GAG GTG GC-3'

5'- CAG GAC CCT CAT GGC CTT GCG-3'

УСЛОВИЯ ПЦР: общий объем — 25–50 мкл, MgCl₂ = 2,5 мМ, dNTP = 2,5 мМ, праймеры 250–500 мкМ, Taq-полимераза = 0,5 ед.а, 94°C — 3 мин (94°C — 30 с; 60°C — 30 с; 72°C — 1 мин; 30–35 циклов); 72°C — 3 мин.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ: 1,5–2%-ный агарозный гель-электрофорез.

Статистическая обработка

В качестве анализируемых показателей использовали частоты встречаемости аллелей и генотипов (сочетаний этих аллелей) по полиморфным локусам генов *DRD2* (2 локуса) и *DRD4* (1 локус) в контрольной группе и группах пациентов.

Для анализа результатов использовалась статистика χ^2 с доверительным интервалом 0,05, позволяющая оценить различия в частоте признака в генеральных совокупностях по частотам признака в ограниченных выборках. Учитывая многообразие аллельных вариантов по некоторым полиморфным локусам (множественные аллели с широким диапазоном частот встречаемости в популяции), мы применили кластерный анализ частот встречаемости, позволяющий выделить группы аллелей или генотипов с максимально сходными частотами (кластеры). После выделения таких кластеров оценивалась степень их гомогенности по тесту χ^2 . В случае значений P (обозначаемого здесь как P_k) много больше 0,05 (обычно мы использовали $P_k > 0,15$, чтобы полностью исключить возможную гетерогенность внутри кластера) проводилось сравнение кластерных частот с использованием статистики χ^2 и применением поправочного коэффициента Бонферрони для множественных сравнений. Полученные значения P обозначались как P_6 и частоты кластеров признавались различными с доверительным интервалом 5% ($P_6 > 0,05$). В этом случае в таблицах данных приводятся внутригрупповые P_k для каждого кластера и P_6 межгруппового сравнения (поправка Бонферрони для множественных сравнений статистики χ^2). Относительный риск (отношение шансов, OR, odds ratio) оценивали как вероятность попадания носителя того или иного

аллеля/генотипа в группу больных. В квадратных скобках указывали 95%-ный доверительный интервал.

Результаты исследования и их обсуждение

Задачей исследования стало сравнение относительных частот встречаемости аллелей, генотипов и tandemных генотипов (сложный генотип сразу по двум полиморфным локусам одного гена) по полиморфным локусам генов дофаминовых рецепторов типов *DRD2* и *DRD4* в группах больных по сравнению с контрольной группой и между группами больных.

Сравнение относительных частот аллелей по полиморфным локусам гена *DRD2* Taq и Nco выявило значительное увеличение частоты аллеля Taq A1 в группе Н по сравнению с контролем (23,51% против 16,41%, $\chi^2=5,56$, $p=0,018$, OR=0,64 [0,44; 0,93]). В группе А частота этого аллеля также превышала значение контрольной группы (20,77%), однако различия не достигали границы значимости ($p>0,05$). Частоты аллелей по полиморфному локусу Nco не различались в изученных группах больных и контрольной группе. Результаты сравнений представлены в табл. 2.

В группе Н мы обнаружили повышение частот двух генотипов по сравнению с контролем: генотипа *DRD2* Taq A1/A2 (39,5% против 20,6%, $\chi^2=15,02$, $P_6=0,0002$, OR=0,4 [0,25; 0,65]) и tandemного генотипа по двум локусам *DRD2* (Taq+Nco) (A1/A2, N1/N1): 19,3% против 9,9% ($\chi^2=24,17$, $P_6=0,0006$, OR=0,41 [0,26; 0,67]). В группе А выявлены сходные изменения частот: повышение частоты генотипа *DRD2* Taq A1/A2 (31,05% против 20,6%, $\chi^2=4,69$, $P_6=0,058$, на границе уровня значимости). В группе А, как и в группе Н, также обнаружено превалирование tandemного генотипа по двум локусам *DRD2* (Taq+Nco) (A1/A2, N1/N1) по сравнению с контролем, хотя и более слабое, чем в группе Н 18,95% против 9,9%, $\chi^2=10,95$, $P_6=0,0488$, OR=0,49 [0,26; 0,93]).

Сравнение двух групп больных между собой показало значимое изменение частот только одного генотипа: снижение частоты генотипа *DRD2* Nco N2/N2 у больных героиновой наркоманией по сравнению с больными алкоголизмом: 8,9% против 15,6%, ($\chi^2=6,46$, $P_6=0,027$). Интересно, что в группе А частота этого генотипа оказалась близка к частоте в контрольной группе (13,74%). Видимо, вследствие этого факта, в группе Н более чем в 2 раза снижена частота tandemного генотипа *DRD2* (Taq+Nco) A2/A2; N2/N2: 6,33% против 14,92% ($\chi^2=18,64$, $P_6=0,001$). В группе А вновь частота этого tandemного генотипа оказалась близка к значению контрольной группы (13,74%).

Таблица 2

Относительные (%) и абсолютные частоты встречаемости аллелей по полиморфным локусам гена *DRD2* Taq и Nco

Аллели	К	А	Н
DRD2 Taq	N=262	N=496	N=638
A1	16,41% (43)	20,77% (103)*	23,51% (150)**
A2	83,59% (219)	79,23% (393)	76,49% (488)
DRD2 Nco	N=262	N=500	N=652
N1	60,31% (158)	62,8% (314)	66,56% (434)
N2	39,69% (104)	37,2% (186)	33,44% (218)
Примечание. ** — $p<0,05$, χ^2 тест, * — тренд χ^2 тест			

Относительные (%) и абсолютные частоты встречаемости генотипов по полиморфным локусам *DRD2* Taq и *DRD2* NcO и tandemных генотипов *DRD2* (Taq+NcO)

Генотипы	К	А	Н
<i>DRD2</i> Taq	N=131	N=248	N=319
A1/A1	6,11% (8)	5,24% (13)	3,76% (12)
A1/A2	20,61% (27)	31,05% (77)*	39,50% (126)**
A2/A2	73,28% (96)	63,71% (158)	56,74% (181)
<i>DRD2</i> NcO	N=131	N=250	N=326
N1/N1	34,35% (45)	41,2% (103)	42,02% (137)
N1/N2	51,91% (68)	43,2% (108)	49,08% (160)
N2/N2	13,74% (18)	15,6% (39)	8,90% (29) ***
<i>DRD2</i> (Taq + NcO)	N=131	N=248	N=316
A1/A1; N1/N2	1,53% (2)	0	0
A1/A1; N1/N1	4,58% (6)	5,24% (13)	3,80% (12)
A1/A2; N1/N1	9,92% (13)	18,95% (47)**	19,30% (61)**
A1/A2; N1/N2	10,69% (14)	11,69% (29)	17,09% (54)
A1/A2; N2/N2	0	0,41% (1)	2,85% (9)
A2/A2; N1/N1	19,85% (26)	17,34% (43)	19,62% (62)
A2/A2; N1/N2	39,69% (52)	31,45% (78)	31,01% (98)
A2/A2; N2/N2	13,74% (18)	14,92% (37)	6,33% (20)

** — $p < 0,05$, χ^2 тест, - тренд на границе значимости χ^2 тест; *** — $p < 0,05$, χ^2 тест, сравнение групп А и Н

Более того, все носители генотипа *DRD2* NcO N2/N2 из контрольной группы оказались одновременно носителями генотипа *DRD2* Taq A2/A2, т.е. обладали tandemным генотипом, частота которого оказалась снижена в группе Н. Результаты сравнений представлены в табл. 3.

Сравнение относительных частот аллелей по полиморфному локусу гена *DRD4* не выявило различий по индивидуальным аллелям или генотипам. Частоты встречаемости аллелей приведены в табл. 4, генотипов — в табл. 5.

В силу множественности аллелей по данному локусу был применен кластерный анализ (см. Материалы и методы). Выявлено значительное снижение частоты кластера аллелей (A2+A3+A8) в группе Н по сравнению с

контролем (11,5% против 21,6%, $P=0,004$, $OR=0,47$ (0,29; 0,75)) и в группе А по сравнению с контролем (13,5%, $P=0,009$, $OR=0,56$ (0,39; 0,82)). Видно, что частоты в группах больных оказались очень близки между собой и различие составило всего 2%. Результаты кластерного анализа представлены в табл. 6.

Сравнение относительных частот генотипов в клинических группах больных по полиморфному локусу гена *DRD4* выявило статистически значимое единообразное превалирование частоты кластера генотипов (2/7+4/4+4/5+4/7) в группах больных с разными видами зависимости: 80% в группе А ($P=0,023$, $OR=0,52$ (0,32; 0,84)), 85% в группе Н ($P=0,011$, $OR=2,41$ (1,31; 4,44)) по сравнению с контрольной группой (68%). Частоты выявленного генотипического кластера в

Таблица 4

Относительные (%) и абсолютные частоты встречаемости аллелей по полиморфному локусу гена *DRD4*

Аллели	К, N=282	А, N=506	Н, N=264
A2	9,22% (26)	6,92% (35)	6,06% (16)
A3	7,80% (22)	3,16% (16)	3,79% (10)
A4	65,6% (185)	70,75% (358)	70,45% (186)
A5	1,06% (3)	1,97% (10)	1,89% (5)
A6	0,71% (2)	0,79% (4)	0,76% (2)
A7	10,99% (31)	12,85% (65)	15,15% (40)
A8	4,61% (13)	3,36% (17)	1,52% (4)
A9	0	0,20% (1)	0,38% (1)

Таблица 5

Относительные (%) и абсолютные частоты встречаемости генотипов по полиморфному локусу гена *DRD4*

Генотипы	K, N=141	A, N=252	H, N=132
2/2	1,42% (2)	1,2% (3)	0,76% (1)
2/5	0,71% (1)	0	0
2/6	0,71% (1)	0	0
2/7	1,42% (2)	2,0% (5)	3,79% (5)
2/8	0,71% (1)	0,4% (1)	0
2/9	0	0,4% (1)	0
3/3	0,71% (1)	0	0,76% (1)
3/6	0	0	0,76% (1)
3/7	1,42% (2)	0,4% (1)	0,76% (1)
3/8	1,42% (2)	0,8% (2)	0
4/2	12,06% (17)	8,33% (21)	6,82% (9)
4/3	11,35% (16)	5,16% (13)	4,55% (6)
4/4	41,13% (58)	50,79% (128)	48,48% (64)
4/5	1,42% (2)	2,78% (7)	3,79% (5)
4/6	0,71% (1)	1,2% (3)	0,76% (1)
4/7	19,15% (27)	19,84% (50)	24,24% (32)
4/8	4,26% (6)	3,17% (8)	3,03% (4)
4/9	0	0	0,76% (1)
5/7	0	0,4% (1)	0
5/8	0	0,4% (1)	0
6/7	0	0,4% (1)	0
7/7	0	0,8% (2)	0,76% (1)
7/8	0	1,2% (3)	0
8/8	1,42% (2)	0,4% (1)	0

Таблица 6

Результаты кластерного анализа частот аллелей по полиморфному локусу гена *DRD4*

Кластеры аллелей	K	A	P6/OR	H	P6/OR
	N=282	N=506		N=264	
(A2+A3+A8)	21,6% (61)	13,5% (68), Pк=0,3	0,009/0,56 [0,39; 0,82]	11,5% (30), Pк=0,54	0,004/0,47 [0,29; 0,75]
Прочие	78,4% (221)	86,5% (438), Pк=0,86		88,5% (234), Pк=0,52	

Рк — значение Р теста χ^2 внутри кластера; Р6 — значение Р теста χ^2 между кластерами с поправкой Бонферрони; значения Рк, Р6 и OR указаны для сравнений с контрольной группой

группах А и Н практически не различались. Результаты кластерного анализа представлены в табл. 7.

Интересно, что хотя разница частот кластера в группах больных составила всего 5%, мы обнаружили высокий относительный риск у больных наркоманией по этому кластеру: вероятность оказаться в группе больных наркоманией у носителя любого генотипа из этого кластера в 2,4 раза выше, чем у носителя генотипа вне кластера.

Мы обнаружили превалирование частоты Таq А1 аллеля в группе Н (статистически достоверное), и в группе А (не достигшее достоверного уровня значимости) по сравнению с частотой в группе контроля. Данные литературы по этому вопросу противоречивы. DRD2 Таq1

А1 аллель впервые был ассоциирован с тяжелым алкоголизмом группой Blum в 1990 г. при изучении RFLP в мозге алкоголиков post mortem [10]. Многие группы не смогли воспроизвести ранее описанные результаты и сделали вывод, что полученные данные не поддерживают ассоциирование между А1 аллелем D2 и алкоголизмом и наркоманиями [8, 9, 16, 17, 18, 27]. Большинство критических отзывов этих исследований обращает внимание на потенциальное смешивание, вытекающее из популяционных примесей вследствие несоответствующего выбора контрольных групп, неспособности исключить из контрольных групп больных с зависимостью от ПАВ и неспособности адекватно и воспроизводимо оценить степень тяжести заболевания.

Результаты кластерного анализа частот генотипов по полиморфному локусу гена *DRD4*

Кластеры генотипов	К	А	Р6/OR	Н	Р6/OR
	N=141	N=252		N=132	
(2/7+4/4+4/5+4/7)	68% (96)	80% (202), $P_k=0,84$	0,023/0,52 [0,32;0,84]	85% (112), $P_k=0,6$	0,011/2,41 [1,31;4,44]
Прочие	32% (45)	20% (50), $P_k=0,80$		15% (20), $P_k=0,75$	
Рк — значение Р теста χ^2 внутри кластера; Р6 — значение Р теста χ^2 между кластерами с поправкой Бонферрони; значения Рк, Р6 и ОР указаны для сравнений с контрольной группой					

По результатам метаанализа многочисленных и противоречивых исследований [23] все же показана значительно более высокая частота аллеля *DRD2* Taq A1 у алкоголиков по сравнению с контрольными индивидуумами, а также ассоциация вариантов гена *DRD2* с другими аддиктивными заболеваниями, включая кокаиновую, никотиновую и опииную зависимости. Conner B.T. et al. [14] предоставили подтверждение *DRD2* A1 аллеля как маркера высокого риска развития проблем с потреблением алкоголя и наркотиков среди детей алкоголиков.

Lawford B.R. et al. [19] изучали пациентов с опиинной зависимостью в амбулаторной метадоновой программе. Частота Taq 1A аллеля гена *DRD2* рецептора составила у пациентов 19,0% по сравнению с 4,6% у контрольных индивидуумов, без анамнеза прошлых и текущих алкогольных и других наркотических злоупотреблений и без семейного анамнеза алкогольных и наркотических злоупотреблений. Более того, среднее потребление героина в течение года, предшествующего началу исследования, было более чем в 2 раза выше у пациентов с A1, чем с A2 аллелем. Shahmoradgoli et al. [26] наблюдали значительное ассоциирование между носительством A1 аллеля и опиинной зависимостью, что сопоставимо с нашими данными по героиновой наркомании.

Таким образом, полученные нами данные, подтверждают возможную вовлеченность *DRD2* A1 аллеля в формирование зависимости от ПАВ. Предполагая существование генетической предрасположенности к зависимости от ПАВ, формирование контрольной группы в любом случае сопряжено со значительными трудностями. Вероятно, наличие в контроле лиц с предрасположенностью, а также сравнительно небольшой размер контрольной группы и не позволили нам выявить достоверные различия по частоте встречаемости этого аллеля у больных алкоголизмом. Тем не менее, факт выявления в группах больных однонаправленных изменений по частоте *DRD2* Taq 1 A1 аллеля может быть хорошим аргументом в пользу определенного вклада этого генетического варианта в патогенез зависимости.

Дополнительным подтверждением вклада A1 аллеля может быть обнаруженное нами увеличение частоты генотипа A1/A2 в обеих группах больных. Именно гетерозиготное состояние носителей аллеля A1, по-видимому, связано с феноменом зависимости, что подтверждается, тем, что гетерозиготный генотип A1/A2 оказался в составе выявленного нами tandemного генотипа A1/A2;N1/N1, частота которого в группах больных более чем в 2 раза выше, чем у контрольной

группы. По результатам гаплотипного анализа Chen W.J. [11] подтвердили, что частота A1/N1 гаплотипа была выше у алкоголиков, чем у контрольной группы, что сопоставимо с нашими данными.

Наибольший интерес представляет обнаружение однонаправленных изменений частот tandemного генотипа *DRD2* (TaqI+NcO) у больных с разными видами зависимости. При полном отсутствии различий по аллелям и генотипам *DRD2* NcO между контрольной группой и группами больных, нам удалось показать однотипные различия по комбинации этих полиморфных локусов, что, безусловно, подтверждает как единство генетических детерминант зависимости, так и необходимость системного анализа множественных вариантов полиморфизма. Вероятно, полиморфный локус NcO, находящейся в кодирующей области гена, оказывает воздействие на структуру D2 рецептора, однако это воздействие проявляет себя только при наличии определенного генотипа по локусу TaqI. Последний лежит вне кодирующей области и может оказывать свое воздействие как регулятор транскрипции. Интересно, что частота другого генотипа локуса NcO, N2/N2 оказалась единственным различием между больными героиновой наркоманией и алкоголизмом. Можно предполагать различный характер периферического повреждения белка D2 рецептора при этих видах зависимости.

В то же время, по сообщению Гареевой с соавторами [5], генотип N2/N2 (NcoI) гена дофамина D2 рецептора (*DRD2*) может служить маркером резистентности к опиинной наркомании, а N1/N1 генотип можно рассматривать в качестве маркера риска заболевания. Эти данные косвенно согласуются с нашими результатами, хотя мы не выявили различий в частоте того или другого генотипа между группами больных и контрольной группой. Юрьев Е.Б. [7] показал, что сочетание генотипов A1/A2, N2/N2 гена D2 рецептора дофамина является «фактором устойчивости» к раннему развитию алкогольной зависимости и острого алкогольного психоза для мужчин — татар. Обнаруженное нами единообразное повышение частоты варианта tandemного генотипа *DRD2* Taq+NcO (A1/A2,N1/N1) как у алкоголиков, так и у наркоманов по сравнению с контролем опровергает эти данные, хотя наши пациенты не рассматривались с точки зрения тяжести течения зависимости.

Мы обнаружили снижение частоты кластера аллелей (A2+A3+A8) по локусу *DRD4* 48 VNTR у больных разными видами зависимости от ПАВ против контрольной группы. Частоты каждого аллеля невелики,

однако рассмотрение кластера аллелей позволяет делать более определенные выводы. Можно предполагать, что варианты сверхкоротких повторов A2 и A3 или наоборот, сверхдлинный A8 в кодирующей области гена *DRD4* могут, возможно, сдерживать развитие патологических нейробиохимических процессов при формировании зависимости, стабилизируя работу рецептора и всей системы дофаминовой нейромедиации. В работе Li T. et al. [20] аллели группировались по условной длине повторов когда D4 VNTR был разделен на «длинные» (5-7 повторов) и «короткие» (2-4 повтора). Значимый избыток длинных аллелей и дефицит коротких наблюдался в группе героинового наркоманов. Также мы выявили единообразное превалирование частоты кластера генотипов *DRD4* (2/7+4/4+4/5+4/7) среди больных как алкоголизмом, так и героиновой наркоманией. Таким образом, 8 аллельных вариантов и 4 аллеля внутри кластера в сравнении с популяционными частотами (в скобках) распределены так: A4 — 50% (65-70%); A7 — 25% (10-15%); A5 — 12,5% (1-2%); A2 — 12,5% (6-9%). Видно, что наибольший сдвиг частот произошел по A5 и A7, а частоты A2 и A4 практически не изменились. Можно предполагать, что действительно, длинные повторы связаны с феноменом зависимости, а короткие, напротив, характерны для здоровых индивидуумов.

Значительное сходство изменений частот аллелей, генотипов и тандемных генотипов по изученным нами полиморфным локусам является явным доказательством существования генетических детерминант, характерных для феномена зависимости. Тот факт, что выявленные детерминанты универсальны для зависимости от разных видов ПАВ (алкоголя и героина в нашем случае) может свидетельствовать о патогенетическом характере системы детерминант, вероятно связанных с генетической предрасположенностью к наркологическим заболеваниям. Мы не изучали группы больных с точки зрения семейной отягощенности по алкоголизму, не рассматривали синдромологию преморбидного состояния. Не проводился анализ динамики и тяжести течения заболеваний. Будущие исследования, возможно, раскроют связь генетических детерминант с теми или иными вариантами течения болезни.

Заключение

Таким образом, мы обнаружили, что частоты аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *DRD2* и *DRD4* в группах больных с зависимостью от ПАВ значительно отличаются от частот контрольной группы. Выявленные различия однотипны для больных алкоголизмом и опийной наркоманией.

Можно заключить, что зависимость от ПАВ связана, хотя бы частично, с определенной структурой генов дофаминовых рецепторов, что может служить прямым доказательством роли генетических факторов в патогенезе зависимости. Нам удалось получить подтверждение полигенного (участие двух генов) и мультилокусного (тандемный генотип по двум локусам одного гена) характера генетических маркеров зависимости от ПАВ. Также, на уровне структуры генов мы выявили проявление единства патогенетического

механизма зависимости от ПАВ, не зависящего от конкретного вида ПАВ. Факт ассоциирования вариантов генов двух типов дофаминовых рецепторов как с алкоголизмом, так и с героиновой наркоманией вновь подтверждает ключевую роль дофаминовой нейротрансмиттерной системы в формировании зависимости от ПАВ.

Список литературы

1. Анохина И.П., Коган Б.М. Влияние алкоголя на метаболизм катехоламинов мозга. // Проблемы алкоголизма. — М.: Медицина, 1974. — С. 90-100.
2. Анохина И.П., Веретинская А.Г., Васильева Г.Н., Овчинников И.В. О единстве биологических механизмов индивидуальной предрасположенности к злоупотреблению различными психоактивными веществами // Физиология человека. — 2000. — Т. 26, №6. — С. 76-83.
3. Анохина И.П., Векшина Н.Л., Веретинская А.Г., Небаракова Т.П., Овчинникова О.И., Дружинина Е.В., Овчинников И.В. Наследственный алкоголизм: некоторые нейробиохимические механизмы // Вестник РАМН. — 1999. — Т. 6. — С. 43-47.
4. Анохина И.П., Иванец Н.Н., Шамакина И.Ю., Кибитов А.О., Воскобоева Е.Ю., Хуснутдинова Э.К. Современные проблемы генетики зависимости от психоактивных веществ // Наркология. — 2004. — №6. — С. 76-83.
5. Гареева А.Э., Юрьев Е.Б., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций NcoI и Taq IA полиморфизма гена D2 рецептора дофамина с опийной наркоманией // Ж. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. — 2004. — Т. 104, №4. — С. 46-49.
6. Москаленко В.Д., Ванюков М.М. Алкоголизм и генетика. — М.: Медицина, 1988. — С. 26-33.
7. Юрьев Е.Б. Анализ генетических ассоциаций полиморфизма в генах кандидатах нейромедиаторной системы с острым алкогольным психозом: Автореф. дисс. на соискание ученой степени к.б.н. — М., 2001.
8. Angheliescu I., Germeyer S., Muller M.J. et al. No association between the dopamine d2 receptor taqi a1 allele and earlier age of onset of alcohol dependence according to different specified criteria // Alcohol Clin. Exp. Res. — 2001. — Jun. — №25 (6). — P. 805-809.
9. Blomqvist O., Gelernter J., Kranzler H.R. Family-based study of DRD2 alleles in alcohol and drug dependence // Am. J. Med. Genet. — 2000. — Oct 9. — №96 (5). — P. 659-664.
10. Blum K., Noble E.P., Sheridan P.J., Finley O., Montgomery A., Ritchie T., Ozkaragoz T., Fitch R.J., Sadlack F., Sheffield D. et al. Association of the A1 allele of the D2 dopamine receptor gene with severe alcoholism // Alcohol. — 1991. — Sep. — Oct. — Vol. 8, №5. — P. 409-416.
11. Chen W.J., Lu M.L., Hsu Y.P. et al. Dopamine D2 receptor gene and alcoholism among four aboriginal groups and Han in Taiwan // Am. J. Med. Genet. — 1997. — Apr. 18. — №74(2). — P. 129-136.
12. Cloninger C.R., Sigvardsson S., Gilligan S.B., von Knorring A.L., Reich T., Bohman M. Genetic heterogeneity and the classification of alcoholism // Adv. Alcohol Subst. Abuse. — 1988. — Vol. 7, №3-4. — P. 3-16.
13. Comings D.E., Blum K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders // Prog. Brain Res. — 2000. — №126. — P. 325-341.
14. Conner B.T., Noble E.P., Berman S.M. et al. DRD2 genotypes and substance use in adolescent children of alcoholics // Drug Alcohol Depend. — 2005. — Sep. 1. — №79(3). — P. 379-387.
15. Dawson D.A., Harford T.C., Grant B.F. Family history as a predictor of alcohol dependence. // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1992. — Jun. — Vol. 16, №3. — P. 572-575.
16. Edenberg H.J., Foroud T., Koller D.L. et al. A family-based analysis of the association of the dopamine D2 receptor (DRD2) with alcoholism // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1998. — Apr. №22 (2). — P. 505-512.
17. Gelernter J., Kranzler H. D2 dopamine receptor gene (DRD2) allele and haplotype frequencies in alcohol dependent and control

subjects: no association with phenotype or severity of phenotype // Neuropsychopharmacology. — 1999. — Jun. — Vol. 20, №6. — P. 640-649.

18. Gorwood P., Batel P., Gouya L. et al. Reappraisal of the association between the DRD2 gene, alcoholism and addiction // Eur. Psychiatry. — 2000. — Mar. — Vol. 15, №2. — P. 90-96.

19. Lawford B.R., Young R.M., Noble E.P. et al. The D(2) dopamine receptor A(1) allele and opioid dependence: association with heroin use and response to methadone treatment // Am. J. Med. Genet. — 2000. — Oct. 9. — Vol. 5, №96. — P. 592-598.

20. Li T., Xu K., Deng H. et al. Association analysis of the dopamine D4 gene exon III VNTR and heroin abuse in Chinese subjects // Mol. Psychiatry. — 1997. — Sep. — Vol. 2, №5. — P. 413-416.

21. Nestler E. Molecular mechanisms of Drug addiction // J. Neuroscience. — 1992. — Vol. 12, №7. — P. 2439-2450.

22. Noble E.P. Alcoholism and the dopaminergic system: a review // Addict. Biol. — 1996. — №1 (4). — P. 333-348.

23. Noble E.P. D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its Phenotypes // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. — 2003. — Jan. 1. — №116 (1). — P. 103-125.

24. Rothhammer F., Rothhammer P., Llop E. Genetics of addictive disorders // Rev. Med. Chil. — 2000. — Nov. — №128 (11). — P. 1279-1282.

25. Schuckit M.A. Twin studies in substance abuse: An overview // Twin research. 3. Epidemiological and Clinical studies. — N.Y.: Alan R. Liss. Inc., 1981. — P. 68-71.

26. Shahmoradgoli Najafabadi M., Ohadi M., Joghataie M.T. et al. Association between the DRD2 A1 allele and opium addiction in the Iranian population // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. — 2005. — Apr. 5. — №134 (1). — P. 39-41.

27. Shaikh K.J., Naveen D., Sherrin T. et al. Polymorphisms at the DRD2 locus in early-onset alcohol dependence in the Indian population // Addict. Biol. — 2001. — Sep. — №6 (4). — P. 331-335.

28. Vanyukov M.M., Tarter R.E. Genetic studies of substance abuse // Drug and Alcohol Dependence. — 2000. — Vol. 59. — P. 101-123.

ASSOCIATION STUDY OF DRD2 AND DRD4 GENES POLYMORPHISM WITH ALCOHOLISM AND HEROIN ADDICTION

KIBITOV A.O., VOSKOBEOVA E.YU., MOISEEV I.A., SHAMAKINA I.YU., ANOKHINA I.P.

Molecular genetics data analysis suggests existence of genetic predisposition to psychoactive substance dependence, and identification of its determinants is the goal of molecular genetic research in addictology. Chronic dysfunction of brain dopaminergic neurotransmitter system is thought to be the neurochemical background of psychoactive substance dependence phenomenon, and first of all it involves reinforcement system. Clinical implications of psychoactive substance dependence represent itself as a super-complex "mosaic" phenotype defined by multiple interaction of genes, primarily of dopaminergic neurotransmitter system. In this context, D2 and D4 receptor genes are of the main interest due to their functional role. This association study aimed to investigate dopamine receptors DRD2 (Taq I, NcoI) and DRD4 (48 bp VNTR) genes polymorphic loci structure in patients with alcoholism (n=252) and heroin addiction (n=326) in comparison with control group (n=141). RESULTS. DRD2 gene. Patients with alcoholism (A) and drug addiction (H) showed similar and unidirectional frequency variation when compared to controls (K): prevalence of the A1 allele frequency (A — 20,77%, H — 23,51% (p=0,018) vs. K — 16,41%), increase in the frequencies of A1/A2 genotype (A — 31,05% (Pb=0,058), H — 39,5% (Pb=0,0002) vs. K — 20,6%) and tandem genotype for two loci (Taq+Nco) (A1/A2, N1/N1): A — 18,95% (Pb=0,0488), H — 19,3% (Pb=0,0006) vs. K — 9,9%. DRD4 gene. Significant reduction of alleles cluster (A2+A3+A8) frequency was found in patients: A — 13,5% (Pb=0,009), H — 11,5% (Pb=0,004) vs. K — 21,6%. Prevalence of genotype cluster (2/7+4/4+4/5+4/7) frequency in groups of patients: A — 80% (Pb=0,023), H — 85% (Pb=0,011, OR=2,41 [1,31; 4,44]), K — 68%. The fact that the revealed gene determinants are universal for different kinds of psychoactive substance dependence (alcohol and heroin in our case) may indicate pathogenetic character of this "system" of determinants, probably associated with genetic predisposition to addiction diseases.