

Функциональный полиморфный локус -1021 С/Т 5'-области гена дофамин-бета-гидроксилазы (DBH) является молекулярно-генетическим маркером высокого риска опийной (героиновой) наркомании

КИБИТОВ А.О.
БРОДЯНСКИЙ В.М.
МОХНАЧЕВ С.О.
АГИБАЛОВА Т.В.
ЧУПРОВА Н.А.
СМИРНОВА Е.В.
ЯСИНОВСКАЯ Т.Н.
ФАЛЫНСКАЯ И.Н.

к.м.н., руководитель лаборатории молекулярной генетики
к.б.н., в.н.сотр. лаборатории молекулярной генетики
к.м.н., руководитель отделения клинических исследований наркоманий
д.м.н., руководитель отделения психотерапии
н.сотр. лаборатории молекулярной генетики
н.сотр. лаборатории молекулярной генетики
н.сотр. лаборатории молекулярной генетики
н.сотр. лаборатории молекулярной генетики
Национальный научный центр наркологии Росздрава,
Москва, Малый Могильцевский пер., д.3. Тел./факс: 8-(499)241-0465. E-mail: druggen@mail.ru

Ген, контролирующий работу дофамин-β-гидроксилазы (DBH), важного элемента дофаминовой нейротрансмиссивной системы, может быть одним из ключевых генов-кандидатов, вовлеченных в этиопатогенез зависимости от психоактивных веществ (ПАВ). Целью настоящего ассоциативного исследования стало сравнительное изучение структуры полиморфных локусов 444 А/С и -1021 С/Т гена DBH у больных алкоголизмом и героиновой наркоманией с различной плотностью семейной отягощенности по наркологическим заболеваниям. Были проанализированы образцы ДНК 958 неродственных между собой мужчин славянской этнической принадлежности (в том числе 446 больных алкоголизмом, 253 больных героиновой наркоманией, 259 здоровых лиц). Генотипирование проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим рестрикционным анализом. Было проведено изучение семейной истории больных и рассчитана плотность семейной отягощенности по наркологическим заболеваниям у каждого больного. По результатам исследования обнаружена взаимосвязь между полиморфизмом -1021 С/Т гена DBH и героиновой наркоманией у мужчин. Превалирование аллеля С и резкое снижение частоты генотипа ТТ оказались характерными как для всей диагностической группы больных героиновой наркоманией ($p = 0,008$, $p = 0,01$), так и для неотягощенных больных ($p = 0,004$, $p = 0,02$). Данные реверсивного анализа подтверждают отсутствие связи этого локуса с плотностью семейной отягощенности. Примечательно, что группы больных алкоголизмом и героиновой наркоманией достоверно различались по частотам как аллеля С ($p = 0,0005$), так и генотипа СС ($p = 0,008$), а изменений частоты генотипа ТТ не обнаружилось. Можно заключить, что функциональный полиморфный локус -1021 С/Т гена DBH, возможно, связан с риском развития героиновой наркомании. Дальнейшие исследования помогут уточнить роль каждого из вариантов локуса в формировании специфических вариантов клинического фенотипа аддикции. Ключевые слова: генный полиморфизм, дофамин-бета-гидроксилаза, алкоголизм, героиновая наркомания, семейная отягощенность

Введение

Согласно данным медицинской генетики [10, 20, 22], наследование предрасположенности к наркологическим заболеваниям, мультифакториальным по природе, относят к полигенному либо олигогенному типу, предполагающему вовлеченность нескольких генов и не подчиняющемуся менделевским принципам. Наследственные факторы играют значительную роль в этиопатогенезе зависимости от ПАВ: описаны факты «накопления» алкоголизма в семьях больных, показано повышение риска заболевания алкоголизмом и наркоманиями в семьях с отягощенной наследственностью [5, 6, 12]. Многие авторы говорят о существовании биологической предрасположенности к зависимости от ПАВ,

закрепленной на генетическом уровне [2, 3, 12], однако природа и механизмы наследования предрасположенности остаются неясными.

Нейрохимической основой феномена зависимости от ПАВ считается хроническая дисфункция дофаминовой (ДА) нейротрансмиссивной системы мозга, в первую очередь, затрагивающая систему подкрепления [1, 2, 6]. Предполагается существование центрального патофизиологического механизма становления и поддержания зависимости от ПАВ [1, 2], находящегося под генетическим контролем, который не зависит от конкретного вида ПАВ и обеспечивает глубокие нейрохимические изменения у будущего больного еще до встречи с ПАВ, что и определяет биологическую базу собственно предрасположенности.

Клинические проявления зависимости от ПАВ выступают в качестве сложного фенотипа (фенотипа аддикции), определяемого многовариантным взаимодействием системы генов (генотипическим профилем аддикции), прежде всего дофаминовой нейротрансмиттерной системы [2]. Значительная фенотипическая (клиническая) гетерогенность болезней зависимости от ПАВ в сочетании с генетической гетерогенностью диктует необходимость функционального подхода к поиску генов-кандидатов, вовлеченных в этиопатогенез зависимости.

Наибольший интерес представляют гены, контролирующие дофаминовую нейротрансмиттерную систему, одним из важнейших нейрохимических звеньев которой является фермент дофамин- β -гидроксилаза (DBH, EC 1.14.17.1), конвертирующий дофамин (ДА) в норадреналин (НА). Уровень активности фермента регулирует действующие в ЦНС концентрации ДА и осуществляет контроль над депо нейромедиатора по принципу обратной связи. В то же время, DBH является стартовым ферментом цепи синтеза НА — важнейшего нейромедиатора, обеспечивающего взаимодействие системы подкрепления и нейроэндокринной системы [20].

Активность DBH определяется в плазме периферической крови и детерминируется генетически как количественный признак [9, 17]. Многие исследователями связывают уровень активности фермента с алкоголизмом [9, 17, 23], наркоманиями [7, 9] и наследственной предрасположенностью к зависимости от ПАВ [2]. Широкое применение в патогенетической терапии алкоголизма препаратов дисульфирама — ингибитора DBH — также обуславливает особый интерес к этому ферменту [4]. По данным Thibault с соавторами [25], хроническое воздействие этанола повышало уровень мРНК DBH и собственно белка фермента *in vitro* в культуре клеток нейробластомы, а острое введение этанола также увеличивало уровень мРНК DBH в надпочечниках мышей.

Таким образом, ген, контролирующий работу DBH — важного элемента ДА нейротрансмиттерной системы — может служить одним из ключевых в «генном ансамбле» этиопатогенеза зависимости от ПАВ.

Многие гены содержат вариабельные участки ДНК (полиморфные локусы), структура которых различна в популяции человека. Предполагается, что определенные варианты полиморфизма могут быть связаны с наследственными заболеваниями. Одним из инструментов генетики полигенных заболеваний является метод ассоциативных исследований, направленный на поиск статистически достоверных различий между частотами встречаемости того или иного варианта полиморфизма в выборках больных по сравнению с контрольной выборкой здоровых субъектов,

а также между группами больных с различными клиническим фенотипами заболевания. Выявление подобных различий подтверждает возможную взаимосвязь, или ассоциацию, между определенным видом полиморфизма и заболеванием. Если известно, что вариант полиморфизма изменяет функционирование продукта экспрессии гена (функциональный полиморфизм), то положительный результат ассоциативного исследования может служить подтверждением вовлечения гена, несущего полиморфный локус, в этиопатогенез заболевания.

В гене *DBH* (хромосомный локус 9q34) известно несколько полиморфных локусов, два из которых связывают с болезнями зависимости от ПАВ [7, 14]: 444 А/С в экзоне 2 и -1021 С/Т в 5'-области гена *DBH* (NCBI db SNP ID: rs 17851478, rs 1611115). Предполагается, что локус -1021 С/Т является функциональным и связан с измененной активностью фермента [9].

Данные о взаимосвязи локусов полиморфизма в гене *DBH* с наркологическими заболеваниями противоречивы [7—9, 11, 15, 17]. Вопрос о связи наследственной отягощенности наркологическими заболеваниями и вариантами этих полиморфных локусов остается неясным. Наследственная отягощенность является наиболее зримым, клинически доступным и анамнестически выявляемым фактором, заставляющим предполагать наличие биологической (генетической) предрасположенности у больного [10]. На наш взгляд, имеет значение не только факт наличия отягощенности, но и ее количественная оценка — плотность отягощенности, оцениваемая как количество случаев наркологических заболеваний в семье пациента [24]. Формальная оценка отягощенности по типу «есть/нет» приводит к объединению в одну группу, например, больных с единственным больным родственником (например, отцом) и больных, где наркологическая патология прослеживается по линии обоих родителей с поражением родственников 2-й и 3-й степени родства. Клинический анализ выявляет широкий спектр плотности отягощенности у наркологических больных: от 1 до 6—9 больных в семье. Большинство исследований рассматривает отягощенность в узком смысле, как правило, в виде алкоголизма отца, реже — обоих родителей. Однако концепция предрасположения [11, 19] предполагает анализ поражения семьи, нескольких поколений.

В рамках представлений о генетике болезней предрасположения, на наш взгляд, плотность отягощенности, как критерий оценки степени поражения семьи больного является достаточно информативным и его значение может использоваться как группирующий параметр [24]. Многочисленные семейные исследования не выявили взаимосвязи между наличием

больных родственников первой степени родства и проявлением специфических фенотипов либо более тяжелых форм наркологической патологии, однако обнаружено нарастание тяжести заболевания по мере увеличения количества больных в семье, независимо от степеней родства [19, 21].

Мы предположили, что в случае связи вариантов полиморфного локуса гена *DBH* с генетической предрасположенностью к болезням зависимости, будет наблюдаться накопление либо элиминация определенных аллелей или генотипов в группах больных с отягощенностью, возможно, пропорциональное плотности отягощенности. Если выявленные варианты полиморфизма являются патогенетическими маркерами предрасположенности, то сдвиги частот, возможно, окажутся близкими для больных алкоголизмом и героиновой наркоманией. Предполагая единство этиопатогенеза болезней зависимости, мы рассматривали больных с зависимостью от разных ПАВ (алкоголя и героина) в сравнительном аспекте.

Целью настоящего ассоциативного исследования стало сравнительное изучение структуры полиморфных локусов 444 А/Г и -1021 С/Т гена *DBH* у больных алкоголизмом и героиновой наркоманией с различной плотностью семейной отягощенности наркологическими заболеваниями.

Материалы и методы

В исследовании принимали участие стационарные пациенты клиники ННЦ наркологии, мужского пола, славянской этнической принадлежности, не родственные между собой. Диагностическую группу больных алкоголизмом составили 446 пациентов с диагнозом *зависимость от алкоголя 2-й, 2—3-й и 3-й стадии* (F-10.2 по МКБ-10), средний возраст — 37,5±6,2 года, диагностическая группа больных наркоманией состояла из 253 пациентов с диагнозом *зависимость от опиатов (героин)* (F-11.2 по МКБ-10), средний возраст — 27,3±4,4 года. Пациенты с верифицированной психопатологией (шизоф-

рения, эндогенные депрессивные расстройства) были исключены из исследования.

Анализ семейной отягощенности по наркологическим заболеваниям и ее плотности проводили в процессе опроса больного и его родственников. Каждая диагностическая группа пациентов была разделена на подгруппы: FH0 (без семейной отягощенности) и FH (отягощенные). В целях выявления эффектов «накопления» наркологической патологии в семье больного для каждого отягощенного больного был произведен расчет «плотности отягощенности» в целях выявления эффектов «накопления» наркологической патологии в семье больного. Плотность отягощенности определяли как количество выявленных кровных родственников с наркологической патологией в семье пациента без учета степени родства, учитывая ограниченную надежность интервьюирования больного и его родственников (как правило, матери) в качестве метода сбора информации о семейной отягощенности, и вероятность как ложноположительных, так и ложноотрицательных данных. Больных с одним кровным родственником с наркологической патологией оказалось в нашей выборке достаточно много, что и обусловило выделение отдельной группы таких больных (FH1, «средняя» плотность). Остальные больные, для которых плотность отягощенности превышала значение 2 (два больных родственника и/или более) составили группу FH2 («высокая» плотность).

Распределение групп больных по плотности семейной отягощенности представлено в табл. 1. Наследственность больных оказалась в основном отягощена алкоголизмом, лишь у пяти больных героиновой наркоманией (2%) выявлены случаи наркомании в роду (у двоих больных — братья, у троих — двоюродные братья). У небольшой части пациентов не удалось получить достоверных сведений о семейной отягощенности (группа НД), и они были исключены из дальнейшего анализа. Расчет производили независимо для выборок, генотипированных по каждому из локусов (444 и -1021).

Таблица 1

Распределение плотности семейной отягощенности в группах больных алкоголизмом и героиновой наркоманией

Группы	N	FH0	FH	FH1	FH2	НД
444						
Алкоголизм	446	0,305** (122)	0,695 (278)	0,405 (162)	0,290 (116)	0,103 (46)
Наркомания	253	0,417 (85)	0,583 (119)	0,343 (70)	0,240 (49)	0,194 (49)
-1021						
Алкоголизм	262	0,269** (61)	0,731 (166)	0,449 (102)	0,282 (64)	0,134 (35)
Наркомания	160	0,419 (54)	0,581 (75)	0,302 (39)	0,279 (36)	0,194 (31)
Примечание. ** — $p < 0,05$ между группами больных; указаны относительные и абсолютные частоты встречаемости больных с различной плотностью отягощенности						

Среди общей группы больных алкоголизмом доля неотягощенных больных была достоверно меньше (30,5% (444) и 26,9% (-1021)), чем в группе больных героиновой наркоманией — 41,7% (444) ($p = 0,006$, $\chi^2 = 7,48$; OR = 1,63 [CI 95% 1,15; 2,31]) и 41,9% (-1021) ($p = 0,003$, $\chi^2 = 8,45$ OR = 1,95 [CI 95% 1,24; 3,08]). Распределение больных по плотности отягощенности (средняя или высокая) оказалось одинаковым и не зависело от вида зависимости.

Контрольную группу составили 259 мужчин (средний возраст $38,5 \pm 7,2$ года) славянской этнической принадлежности, не родственные между собой, без диагностических признаков наркологической патологии. Оценка семейной отягощенности по наркологическим заболеваниям участников контрольной группы не была возможной. Согласно данным Johnson с соавторами, проанализировавших выборку объемом более 32 тыс. чел. [14], для здоровых в отношении наркологических заболеваний субъектов плотность семейной отягощенности по алкоголизму составила 7%, что дает основание считать группу контроля условно свободной от отягощенности и проводить корректные сравнения с этой группой.

Все лица были проинформированы о характере проводимого научного исследования и дали письменное согласие на забор крови.

Генотипирование

Для изучения были выбраны полиморфные локусы гена *DBH*, относящиеся к классу однонуклеотидных замен: 444 A->G (Экзон 2. rs 17851478, в тексте: (444)) и -1021 C->T (5'-область, rs 1611115, в тексте: (-1021)). Образцы ДНК пациентов, полученных из венозной крови путем фенол-хлороформной экстракции, генотипировали методом ПЦР с последующим рестрикционным анализом с использованием эндонуклеаз рестрикции: BstEN I (для локуса 444) и Fau I (для локуса -1021). Условия реакции и дизайн олигонуклеотидных праймеров доступен по запросу.

Дизайн исследования

Общие группы больных алкоголизмом и героиновой наркоманией сравнивали с контрольной группой. В целях выявления влияния семейной отягощенности и ее плотности на распределение частот аллелей и генотипов полиморфных локусов проводили независимое сравнение подгрупп больных (без отягощенности, с отягощенностью и с разной плотностью отягощенности) из каждой диагностической группы с группой контроля. Далее, вновь в каждой диагностической группе, подгруппы (с отягощенностью и с разной плотностью отягощенности) сравнивались с подгруппой больных без отягощенности. Кроме того, проводили сравнение больных с высокой и средней плотностью отягощенности между собой.

На финальном этапе сравнивали больных из разных диагностических групп между собой: общие

группы, группы без отягощенности, группы с отягощенностью и подгруппы с одинаковой плотностью отягощенности.

Статистическая обработка

В качестве анализируемых показателей использовали частоты встречаемости аллелей и генотипов по полиморфным локусам 444 и -1021 гена *DBH* в контрольной группе и группах пациентов. Для выявления различий частот аллелей использовалась статистика χ^2 с доверительным интервалом 5% для таблицы 2x2. При анализе частот генотипов применяли метод иерархической агломеративной кластеризации частот, позволяющий выделить в итоге 2 группы генотипов с максимально сходными частотами (кластеры генотипов) для последующего анализа с помощью статистики χ^2 для таблицы 2x2. Используется пошаговый алгоритм кластеризации в пространстве расстояний статистики χ^2 , на первом шаге все генотипы представляют собой отдельные кластеры. На следующем шаге объединяются кластеры (генотипы) с наиболее близкими отношениями частот в двух группах. После выделения таких итоговых кластеров оценивалась степень их внутренней 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 частот итоговых кластеров с использованием статистики χ^2 . Для коррекции множественных сравнений, возникающих в процессе кластеризации, использовали инвертированный вид поправки Бонферрони путем умножения значений P , полученных при сравнении двух итоговых кластеров на n (число сравнений). Полученные значения P далее обозначались как P_6 и различия признавались достоверными при $P_6 < 0,05$. Относительный риск (отношение шансов, OR, odds ratio) при сравнении групп оценивали как вероятность попадания носителя того или иного аллеля/генотипа в одну из групп сравнения с 95%-ным доверительным интервалом (CI 95%).

Результаты исследования

По результатам генотипирования были получены абсолютные и относительные частоты встречаемости аллелей и генотипов (табл. 2, 3) по полиморфным локусам 444 и -1021 гена *DBH* в группах сравнения (см. Материалы и методы). В связи с тем, что не все больные были генотипированы по локусу -1021, анализ частот гаплотипов по двум локусам одновременно не проводился. Результаты кластерного анализа частот генотипов приведены в табл. 4. Отклонений от равновесия Харди—Вайнберга в диагностических группах и контрольной группе не выявлено. Частоты аллелей и генотипов в группе контроля не отличались от среднепопуляционных для европейской популяции [16].

Таблица 2

Относительные (%) и абсолютные частоты встречаемости аллелей и генотипов по полиморфным локусам 444 и -1021 гена *DBH* в диагностических группах пациентов и контрольной группе

	Алкоголизм	Наркомания	Контроль
Аллели			
<i>DBH</i> 444	N = 892	N = 506	N = 518
A	0,489 (437)	0,496 (251)	0,486 (252)
G	0,510 (455)	0,504 (255)	0,513 (266)
<i>DBH</i> 1021	N = 524	N = 320	N = 348
C	0,727 (381) [#]	0,831 (266)**	0,747 (260)
T	0,273 (143)	0,169 (54)	0,253 (88)
Генотипы			
<i>DBH</i> 444	N = 446	N = 253	N = 259
AA	0,249 (111)	0,261 (66)	0,251 (65)
AG	0,482 (215)	0,470 (119)	0,471 (122)
GG	0,270 (120)	0,269 (68)	0,278 (72)
<i>DBH</i> 1021	N = 262	N = 160	N = 174
CC	0,553 (145) [#]	0,694 (111)	0,603 (105)
CT	0,347 (91)	0,375 (44)	0,287 (50)
TT	0,099 (26)	0,031 (5)**	0,109 (19)
Примечание. ** — $p < 0,05$; * — тренд при сравнениях с контрольной группой; [#] — $p < 0,05$ между группами больных			

Таблица 3

Относительные (%) и абсолютные частоты встречаемости аллелей и генотипов по полиморфным локусам 444 и 1021 гена *DBH* в группах пациентов диагностических групп с различной плотностью семейной отягощенности

	FH0		FH		FH1		FH2		К
Аллели									
	A	H	A	H	A	H	A	H	
444	N = 248	N = 170	N = 554	N = 238	N = 322	N = 140	N = 232	N = 98	N = 518
A	0,484 (120)	0,518 (88)	0,490 (271)	0,475 (113)	0,484 (156)	0,471 (66)	0,496 (115)	0,480 (47)	0,486 (252)
G	0,516 (128)	0,482 (82)	0,510 (283)	0,525 (125)	0,516 (166)	0,529 (74)	0,504 (117)	0,520 (51)	0,513 (266)
1021	N = 122	N = 108	N = 332	N = 150	N = 204	N = 78	N = 128	N = 72	N = 348
C	0,762 (93)	0,880 (95)**	0,738 (245)	0,813 (122)	0,725 (148)	0,782 (61)	0,758 (97)	0,847 (61)*	0,513 (266)
T	0,238 (29)	0,120 (13)	0,262 (87)	0,187 (28)	0,275 (56)	0,218 (17)	0,242 (31)	0,153 (11)	0,252 (88)
Генотипы									
	A	H	A	H	A	H	A	H	К
444	N = 124	N = 85	N = 277	N = 119	N = 161	N = 70	N = 116	N = 49	N = 259
AA	0,250 (31)	0,282 (24)	0,246 (68)	0,252 (30)	0,248 (40)	0,286 (20)	0,241 (28)	0,204 (10)	0,251 (65)
AG	0,468 (58)	0,471 (40)	0,487 (135)	0,445 (53)	0,472 (76)	0,371 (26)	0,509 (59)	0,551 (27)	0,471 (122)
GG	0,282 (35)	0,247 (21)	0,267 (74)	0,303 (36)	0,280 (45)	0,343 (24)	0,250 (29)	0,245 (12)	0,278 (72)
1021	N = 61	N = 54	N = 166	N = 75	N = 102	N = 39	N = 64	N = 36	N = 174
CC	0,606 (37)	0,759 (41)	0,560 (93)	0,667 (50)	0,539 (55)	0,641 (25)	0,594 (38)	0,694 (25)	0,603 (105)
CT	0,311 (19)	0,241 (13)	0,355 (59)	0,293 (22)	0,373 (38)	0,282 (11)	0,328 (21)	0,306 (11)	0,287 (50)
TT	0,082 (5)	0 (0)**	0,085 (14)	0,040 (3)	0,088 (9)	0,077 (3)	0,078 (5)	0 (0)	0,109 (19)
Примечание. А — алкоголизм; Н — героиновая наркомания; К — контроль; ** — $p<0,05$; * — тренд при сравнениях с контрольной группой; # — $p<0,05$ между группами больных									

Сравнение больных алкоголизмом и подгрупп больных алкоголизмом с разной плотностью семейной отягощенности с контролем и между группами не выявило сдвига частот аллелей или генотипов по изученным полиморфным локусам. Не обнаружено достоверных сдвигов частот в группе больных героинового наркомазией по локусу 444.

Сравнение больных героинового наркомазией с контрольной группой выявило достоверное повышение частоты аллеля С (83,13 и 74,71%, $p = 0,008$, $\chi^2 = 7,05$ ($df = 1$); OR = 1,66 [CI 95% 1,14; 2,42] и снижение частоты генотипа ТТ (3,1 и 10,9%, $P_6 = 0,01$, $\chi^2 = 7,59$ ($df = 1$), OR = 3,55 [CI 95% 1,34; 9,37], табл. 4.1). Подобные сдвиги частот характерны для неотягощенных больных героинового наркомазией в сравнении с контрольной группой: повышена частота аллеля С (87,96 и 74,71%, $p = 0,004$, $\chi^2 = 8,39$ ($df = 1$); OR = 2,4 [CI 95% 1,29; 4,46]); носители генотипа ТТ не выявлены (0% и 10,92%, $P_6 = 0,022$, $\chi^2 = 6,43$ ($df = 1$), OR = 13,67 [CI 95% 0,81; 230,26], табл. 4.2). Несмотря на номинальную достоверность различий в частотах генотипа ТТ, большой доверительный интервал не позволяет обсуждать результаты. Больные из общей группы отягощенных и со средней плотностью отягощенности не отличались от контроля, однако в группе с высокой плотностью отягощенности вновь выявлены превалирование аллеля С (84,72 и 51,3%, $p = 0,069$, тренд) и снижение частоты генотипа ТТ (0% и 10,9%, $P_6 = 0,075$, тренд, табл. 4.3).

Таким образом, различия частот по локусу -1021 между больными героинового наркомазией и контролем возникают за счет как неотягощенных больных, так и больных с высокой плотностью отягощенности. Сравнение больных наркомазией с разной плотностью отягощенности между собой не выявило различий, хотя и имеется тренд к повышению частоты аллеля С (88%) у неотягощенных больных по сравнению с больными со средней плотностью отягощенности (72%, $p = 0,074$).

Сравнение больных алкоголизмом и героинового наркомазией выявило повышение частоты аллеля С среди больных наркомазией (83,13 и 72,70%, $p = 0,0005$, $\chi^2 = 12,04$ ($df = 1$), OR = 1,84 [CI 95% 1,3; 2,61]; также в этой группе повышена частота генотипа СС (69,38 и 55,34%, $P_6 = 0,008$, $\chi^2 = 8,2$ ($df = 1$), OR = 1,82 [CI 95% 1,2; 2,75], табл. 4.4). Различия между неотягощенными больными из диагностических групп выражаются в повышении частоты аллеля С среди больных наркомазией (87,96 и 76,23%, $p = 0,021$, $\chi^2 = 5,28$ ($df = 1$), OR = 2,23 [CI 95% 1,1; 4,51] и исчезновении носителей генотипа ТТ в этой группе (0% и 8,20%, $P_6 = 0,062$, тренд, табл. 4.5). Сравнение отягощенных больных

из разных диагностических групп не выявило различий независимо от плотности отягощенности.

В целях верификации полученных данных о связи вариантов генотипов с плотностью семейной отягощенности, был проведен обратный (реверсивный) анализ распределения плотности отягощенности в генотипических группах (геногруппах) пациентов, которые формировали по факту выявления носительства определенного генотипа по полиморфным локусам 444 и -1021 гена *DBH*. Проводили попарное сравнение геногрупп внутри одной диагностической группы и сравнение носителей одинакового генотипа из разных диагностических групп. Распределение плотности семейной отягощенности не различается в генотипических группах больных алкоголизмом и наркомазией (табл. 5), что может дополнительно свидетельствовать об отсутствии связи вариантов локусов 444 и -1021 с плотностью семейной отягощенности по наркологическим заболеваниям.

Обсуждение результатов

Согласно нашим данным, полиморфный локус 444 А/С гена *DBH* не связан ни с алкоголизмом, ни с героинового наркомазией, а также с наследственной отягощенностью по наркологическим заболеваниям, что согласуется с данными Freire с соавторами [11]. Мы не подтвердили превалирования аллеля А у больных алкоголизмом, описанных Kohnke с соавторами [15]. В то же время Cubells с соавторами [7] сообщают о подобных изменениях частот у больных кокаиновой наркомазией. Возможной причиной несовпадения данных, а часто и конфликтных результатов в подобных исследованиях может считаться проблема подбора адекватных клинических и контрольных групп. Если в клинических группах противоречия могут быть устранены согласованием классификации заболевания, например «злоупотребление» или «зависимость», то в отношении контрольных групп вопрос связан с самой сущностью представления о предрасположенности к заболеванию, в нашем случае к аддикции. Предрасположенность является необходимым, но не достаточным условием для развития заболевания и не может считаться детерминирующим фактором, однозначно приводящим к манифестации заболевания. Следовательно, в любой группе контрольных индивидуумов существует доля субъектов с предрасположенностью и как следствие, в рамках нашей гипотезы, эти субъекты являются носителями генотипического профиля аддикции. Присутствие таких носителей в любой группе здоровых лиц снижает достоверность различий в частотах встречаемости элементов генотипического профиля аддикции и, в случае незначительных различий частот, нивелирует эти различия. Таким образом, значимость ассоциативных различий существенно зависит от но-

минальной величины разницы частот, размеров выборки как контрольных, так и клинических групп.

С другой стороны, обнаружение достоверных ассоциаций между группами пациентов и контрольной группой говорит о реально существующем сдвиге частот, фактически более значительном, чем выявляемые номинальные значения. С этой точки зрения, особую ценность представляет сравнение частот элементов генопрофилей аддикции между группами пациентов.

Наши данные позволяют предположить, что, вероятно, локус -1021 связан с риском заболевания героиновой наркоманией. Превалирование аллеля С и резкое снижение частоты генотипа ТТ оказалось характерным как для всей диагностической группы больных героиновой наркоманией, так и для неотягощенных больных и больных с высокой плотностью отягощенности. Данные реверсивного анализа подтверждают отсутствие связи этого локуса с плотностью семейной отягощенности. Примечательно, что группы больных алкоголизмом и

Таблица 4

Результаты кластерного анализа частот генотипов по локусу -1021 С/Т гена DBH

Кластеры генотипов	Группы сравнения и частоты кластеров		Достоверность различий (значения P6, χ^2 и OR)
1.	Наркомания (n = 160)	Контроль (n = 174)	P6 = 0,01; χ^2 = 7,59 (df = 1); OR = 3,55 [CI 95% 1,34; 9,37]
ТТ Pk = 1	0,031 (5)	0,109 (19)	
(CC+CT) Pk = 0,46	0,969 (155)	0,891 (155)	
2.	Наркомания (FH0) (n = 54)	Контроль (n = 174)	P6 = 0,02; χ^2 = 6,43 (df = 1); OR = 13,67 [CI 95% 0,81; 230,26]
ТТ Pk = 1	0 (0)	0,109 (19)	
(CC+CT) Pk = 0,46	1 (54)	0,891 (155)	
3.	Наркомания (FH2) (n = 36)	Контроль (n = 174)	P6 = 0,075; тренд
ТТ Pk = 1	0 (0)	0,109 (19)	
(CC+CT) Pk = 0,84	1 (36)	0,891 (155)	
4.	Алкоголизм (n = 262)	Наркомания (n = 160)	P6 = 0,008; χ^2 = 8,20 (df = 1); OR = 1,82 [CI 95% 1,2; 2,75]
CC Pk = 1	0,553 (145)	0,694 (111)	
(CT+TT) Pk = 0,69	0,447 (117)	0,306 (49)	
5.	Алкоголизм (FH0) (n = 61)	Наркомания (FH0) (n = 54)	P6 = 0,06; тренд
ТТ Pk = 1	0,082 (5)	0	
(CC+CT) Pk = 0,26	0,918 (56)	1 (54)	

Таблица 5

Распределение плотности семейной отягощенности в геногруппах пациентов диагностических групп

Вид ПАВ	Геногруппы	FH0	FH	FH1	FH2
DBH 444					
Алкоголь	AA	0,313 (31)	0,687 (68)	0,404 (40)	0,283 (28)
	AG	0,292 (56)	0,708 (136)	0,401 (77)	0,307 (59)
	GG	0,321 (35)	0,679 (74)	0,412 (45)	0,366 (29)
Героин	AA	0,444 (24)	0,556 (30)	0,370 (20)	0,185 (10)
	AG	0,430 (40)	0,570 (53)	0,280 (26)	0,290 (27)
	GG	0,368 (21)	0,632 (36)	0,421 (24)	0,210 (12)
DBH -1021					
Алкоголь	CC	0,285 (37)	0,715 (93)	0,423 (55)	0,292 (38)
	CT	0,244 (19)	0,756 (59)	0,487 (38)	0,269 (21)
	TT	0,263 (5)	0,737 (14)	0,474 (9)	0,263 (5)
Героин	CC	0,451 (41)	0,549 (50)	0,275 (25)	0,275 (25)
	CT	0,371 (13)	0,628 (22)	0,314 (11)	0,314 (11)
	TT	0 (0)	0,100 (3)	0,100 (3)	0 (0)

героиновой наркоманий достоверно различались по частотам как аллеля С, так и генотипа СС, а изменений частоты генотипа ТТ не обнаружилось.

По данным Kohnke с соавторами [16], аллель Т значимо ассоциирован с низкой активностью DBH плазмы крови. Следовательно, по нашим данным, среди больных наркоманией доля индивидуумов с низкой активностью фермента значительно снижена, что согласуется с данными Macedo с соавторами [18], обнаруживших тенденцию к увеличению активности DBH плазмы крови у субъектов с полинаркоманией (героин + кокаин). М.А. Schuckit с соавторами [22] обнаружили сниженный на 20% уровень относительной активности DBH у здоровых субъектов с выраженной семейной отягощенностью по алкоголизму. В то же время, Cubells с соавторами [8] не удалось доказать прямой связи между уровнями фермента в плазме и тем или иным вариантом генотипа по локусу -1021C/T. Функциональное значение этого локуса полиморфизма связывают в основном с его ролью в транскрипции гена и участием в долгосрочной регуляции работы самого фермента. Так, S. Hassan с соавторами [13] на культуре клеток нейробластомы показали, что этанол *in vitro* (25—200 mM) вызывал повышение уровня транскрипции гена *DBH*, зависимое от концентрации и времени.

Можно заключить, что функциональный полиморфный локус -1021 C/T гена *DBH*, возможно, связан с риском развития героиновой наркомании. Дальнейшие исследования помогут уточнить роль каждого из вариантов локуса в формировании специфических вариантов клинического фенотипа аддикции.

Список литературы

1. 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.
2. Анохина И.П., Кибитов А.О., Шамакина И.Ю. Генетика зависимости от психоактивных веществ // Наркология: Национальное руководство. — М.: Гэотар-Медиа, 2008. — С. 52—84.
3. Бочков Н.П., Асанов А.Ю., Аксенова М.Г., Новиков А.В., Демикова Н.С. Генетические факторы в этиологии и патогенезе наркоманий // Наркология. — 2003. — №1. — С. 7—14.
4. Caroldi S., De Paris P., Zotti S. et al. Effects of disulfiram on serum dopamine-beta-hydroxylase and blood carbon disulphide concentrations in alcoholics // J. Appl. Toxicol. — 1994. — Mar.—Apr. — №14(2). — P. 77—80.
5. 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. — №7(3—4). — P. 3—16.
6. Comings D.E., Blum K. Reward deficiency syndrome: genetic aspects of behavioral disorders // Prog. Brain Res. — 2000. — №126. — P. 325—341.
7. Cubells J.F., Kranzler H.R., McCance-Katz E. et al. A haplotype at the DBH locus, associated with low plasma dopamine beta-hydroxylase activity, also associates with cocaine-induced paranoia // Mol. Psychiatry. — 2000. — Jan. — №5(1). — P. 56—63.
8. Cubells J.F., Price L.H., Meyers B.S. et al. Genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase activ-

ity in psychotic unipolar major depression // Biol. Psychiatry. — 2002. — Mar. 1. — №51(5). — P. 358—364.

9. Cubells J.F., Zabetian C.P. Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology // Psychopharmacology (Berl.). — 2004. — Aug. — №174(4). — P. 463—476.

10. Dawson D.A., Harford T.C., Grant B.F. Family history as a predictor of alcohol dependence // Alcohol Clin. Exp. Res. — 1992. — Jun. — №16(3). — P. 572—575.

11. Freire M.T., Hutz M.H., Bau C.H. The DBH -1021 C/T polymorphism is not associated with alcoholism but possibly with patients' exposure to life events // J. Neural Transm. — 2005. — Sep. — №112(9). — P. 1269—1274.

12. Gorwood P. Contribution of genetics to the concept of risk status for alcohol dependence // J. Soc. Biol. — 2000. — №194(1). — P. 43—49.

13. Hassan S., Duong B., Kim K.S. et al. Pharmacogenomic analysis of mechanisms mediating ethanol regulation of dopamine beta-hydroxylase // J. Biol. Chem. — 2003. — Oct. 3. — №278(40). — P. 38860—38869.

14. Johnson E.O., Pickens R.W. Familial transmission of alcoholism among nonalcoholics and mild, severe, and dyssocial subtypes of alcoholism // Alcohol Clin. Exp. Res. — 2001. — May. — №25(5). — P. 661—666.

15. Kohnke M.D., Kolb W., Kohnke A.M. et al. DBH(*)444G/A polymorphism of the dopamine-beta-hydroxylase gene is associated with alcoholism but not with severe alcohol withdrawal symptoms // J. Neural Transm. — 2006. — Jul. — №113(7). — P. 869—876.

16. Kohnke M.D., Zabetian C.P., Anderson G.M. et al. A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function // Biol. Psychiatry. — 2002. — Dec. 15. — №52(12). — P. 1151—1158.

17. Lykouras E., Markianos M., Moussas G. Platelet monoamine oxidase, plasma dopamine beta-hydroxylase activity, dementia and family history of alcoholism in chronic alcoholics // Acta Psychiatr. Scand. — 1989. — Nov. — №80(5). — P. 487—491.

18. Macedo T.R., Ribeiro C.A., Morgadinho T. et al. Influence of concurrent heroin and cocaine abuse on the adrenergic and serotonergic systems in man // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1998. — May 30. — №844. — P. 208—213.

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

20. Schank J.R., Ventura R., Puglisi-Allegra S. et al. Dopamine beta-hydroxylase knockout mice have alterations in dopamine signaling and are hypersensitive to cocaine // Neuropsychopharmacology. — 2006. — Oct. — №31(10). — P. 2221—2230.

21. 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.

22. Schuckit M.A., O'Connor D.T., Duby J. et al. Dopamine-beta-hydroxylase activity levels in men at high risk for alcoholism and controls // Biol. Psychiatry. — 1981. — Nov. — №16(11). — P. 1067—1075.

23. Sellers E.M., Cooper S.D., Roy M.L. Variations in serum dopamine beta-hydroxylase in normal subjects and chronic alcoholics // Can. J. Physiol. Pharmacol. — 1978. — Oct. — №56(5). — P. 806—811.

24. Stoltenberg S.F., Mudd S.A., Blow F.C., Hill E.M. Evaluating measures of family history of alcoholism: density versus dichotomy // Addiction. — 1998. — Oct. — №93(10). — P. 1511—1520.

25. Thibault C., Lai C., Wilke N. et al. Expression profiling of neural cells reveals specific patterns of ethanol-responsive gene expression // Mol. Pharmacol. — 2000. — Dec. — №58(6). — P. 1593—1600.

**THE FUNCTIONAL POLYMORPHISM -1021 C/T
IN 5'-REGION OF DOPAMINE-BETA-HYDROXYLASE (*DBH*) GENE
IS ASSOCIATED WITH OPIATE (HEROIN) DEPENDENCE**

KIBITOV A.O. MD., PhD, head of molecular genetics laboratory
BRODYANSKY V.M. MD., PhD, senior researcher of molecular genetics laboratory
MOKHNACHEV S.O. MD., PhD, head of drug addiction clinical research unit
AGIBALOVA T.V. MD., PhD, head of psychotherapy unit
CHUPROVA N.A. researcher of molecular genetics laboratory
SMIRNOVA E.V. researcher of molecular genetics laboratory
YASINOVSKAYA T.N. researcher of molecular genetics laboratory
FALYNSKOVA I.N. researcher of molecular genetics laboratory

National Research Center on Addiction:
M. Mogilytsevsky per., 3, Moscow, Russia.
Phone/fax: +7(499)241-0465. E-mail: druggen@mail.ru

Gene, coding enzyme dopamine-beta hydroxylase (DBH), the important element of dopamine neurotransmitter system, is a possible key gene-candidate involved in the etiopathogenesis of substance abuse. The purpose of this association study was to explore structure of polymorphic loci 444 A/G and -1021 C/T of *DBH* gene in alcohol- and heroin-dependent patients with different density of family history.

Methods. DNA samples from total 958 Russian Slavic ethnic group unrelated male subjects (446 alcohol-dependent patients, 253 heroin dependent patients and 259 healthy controls) were examined. Family history of patients was analyzed and density of family history was evaluated for each patient. Genotyping was performed using PCR-RFLP. **Results.** Association between -1021 C/T polymorphism of *DBH* gene and heroin addiction was found. Prevalence of C allele and dramatic reduction of TT genotype frequency were characteristic for both: the total diagnostic cohort of heroin addicts ($p = 0,008$, $p = 0,01$), and subgroup of heroin addicts with negative family history ($P = 0,004$, $p = 0,02$). The reverse analysis data confirms the absence of association between this locus and density of family history. Remarkable is the significant difference in frequencies of C allele ($p = 0,0005$), and CC genotype ($p = 0,008$) between cohorts of alcohol-dependent patients and heroin addicts, but no difference in TT genotype frequency. **Conclusion.** Functional polymorphic locus -1021 C/T of *DBH* gene is possibly associated with the risk of heroin addiction development. Further studies will help to elucidate the role of each locus variants in forming specific phenotypes of addiction.