

УДК 575.1: 615.2

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *OPRM1* У КРЫС ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ N-(1-ФЕНЭТИЛ-4-ПИПЕРИДИЛ)-ПРОПИОНАНИЛИДА

И.С. Бердинских¹, Н.С. Осечкина¹,
А.В. Бабкин¹, А.С. Никифоров¹,
Г.В. Назаров¹, В.Н. Быков¹,
М.Б. Иванов²

¹Научно-исследовательский испытательный институт военной медицины Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, 195043, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²Федеральное государственное учреждение науки «Институт Токсикологии» Федерального медико-биологического агентства России, 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Исследованы генетические особенности, определяющие различный уровень экспрессии гена *Orpm1* у белых нелинейных крыс после воздействия n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в дозе 1 ЛД₅₀. Изучено распределение 6 полиморфных вариантов гена *Orpm1* крыс: rs8174389, rs105312806, rs197580673, rs199420908, rs105551578, rs105958511, которые могут обуславливать восприимчивость животных к воздействию агонистов опиоидных рецепторов. Обнаружено генетическое разнообразие в аллельных вариантах для 3 полиморфизмов (rs105312806, rs105958511, rs105551578). Анализ экспериментальных данных по выявлению зависимости экспрессии гена от его полиморфизмов продемонстрировал статистически значимую ($p < 0,05$) ассоциацию генотипа AA полиморфизма rs105312806 и генотипа AA полиморфизма rs105958511 с более низким уровнем экспрессии гена *Orpm1* в спинном мозге крыс спустя 24 часа после воздействия n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида, по сравнению с животными с генотипами TT и GG, соответственно.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, ген *Orpm1*, экспрессия, n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид

Введение. Применение опиоидных анальгетиков широко распространено в медицине в качестве обезболивающих средств. При использовании опиоидов основными фармакологическими эффектами являются антиноцицепция, седация и анальгезия. При этом они обладают рядом побочных эффектов, таких как: угнетение дыхания, гипоксия, гипотензия, гипотермия, тошнота, рвота, пристрастие и привыкание [1,2]. Развитие побочного действия, как правило, является дозозависимым и накладывает определенные ограничения на широкое использование наркотических анальгетиков в терапевтической практике. Эффективные дозы наркотических анальгетиков

существенно варьируются у человека, при этом индивидуальная чувствительность к препаратам данного класса может быть обусловлена как половыми, возрастными, эмоциональными, патологическими, так и генетическими факторами.

Механизм действия наркотических анальгетиков основан на их взаимодействии с μ -опиоидными рецепторами, обнаруженными в головном и спинном мозге [3,4]. Известно, что ген *Orpm1* крыс, кодирующий μ -опиоидные рецепторы, локализован на коротком плече первой хромосомы (локус 1p11) и содержит значительное число однонуклеотидных замен (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) [5,6]. В литературе описыва-

Бердинских Ирина Сергеевна (Berdinskih Irina Sergeevna), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, irina_berdinskih@mail.ru.

Осечкина Наталья Сергеевна (Osechkina Natalya Sergeevna), младший научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, dunats@ambler.ru.

Бабкин Александр Владимирович (Babkin Aleksandr Vladimirovich), научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, babkinnik@yandex.ru.

Никифоров Александр Сергеевич (Nikiforov Aleksandr Sergeevich), кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник НИИИ ВМ ВМедА имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, nikiforov2004@mail.ru.

Назаров Георгий Валерьевич (Nazarov Georgiy Valerevich), доктор химических наук, доцент, начальник отдела НИИИ ВМ ВМедА имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, denis-100@list.ru.

Быков Владимир Николаевич (Bykov Vladimir Nikolaevich), доктор медицинских наук, доцент, начальник центра НИИИ ВМ ВМедА имени С.М. Кирова Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, bykov_imm@yahoo.com.

Иванов Максим Борисович (Ivanov Maksim Borisovich), доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, m.b.ivanov@toxicology.ru

ются результаты исследований о влиянии полиморфизмов гена OPRM1 человека на индивидуальное восприятие ноцицептивного стимула [7,8] и развитие различных побочных эффектов при применении наркотических анальгетиков [7,9,10,11]. Несмотря на большое количество публикаций, посвященных данной проблеме, полученные к настоящему времени результаты не нашли широкого применения в клинической практике. В то же время прогнозирование индивидуальных особенностей действия наркотических анальгетиков на организм позволит повысить безопасность их применения и определить более эффективные подходы к проведению терапии при интоксикациях. Для разработки подходов к индивидуализации, на первом этапе целесообразно провести исследования по выявлению ассоциации генетических полиморфизмов и уровня экспрессии гена Oprm1 с использованием лабораторных животных.

В этой связи целью настоящей работы было исследование распределения аллельных вариантов гена Oprm1 у белых беспородных крыс, а также установление ассоциации полиморфизмов с уровнем экспрессии исследуемого гена в головном и спинном мозге крыс после воздействия n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида.

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены на белых нелинейных крысах-самцах массой 180-240 г, содержащихся в условиях вивария (питомник РАМН «Рапполово», Ленинградская область). За 12 ч до начала эксперимента животных лишали пищи. Животным однократно внутримышечно вводили n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилид в дозе 1 ЛД₅₀. ДНК для проведения генотипирования выделяли через 1 сут из образцов периферической венозной крови с использованием автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NorDiag Arrow» (Швеция) и коммерческого набора «Arrow Blood DNA Kit 500» (Швеция) по протоколу «DNA Blood 500».

Тотальную РНК для проведения анализа экспрессии выделяли из образцов спинного и головного мозга крыс с использованием автоматической станции для выделения нуклеиновых кислот «NorDiag Arrow» (Швеция) и коммерческого набора «Arrow RNA» (Швеция) по протоколу «RNA v.2.1». Выделенную РНК переводили в кДНК по протоколу High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems (США). Измерение концентрации выделенных образцов ДНК и РНК осуществляли с использованием спектрофотометра «BioSpec-nano» (Япония).

Для определения полиморфизмов гена Oprm1 крыс проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на амплификаторе «QuantStudio 12K Flex»,

Applied Biosystems (США), с использованием коммерческих праймеров и зондов, синтезированных и нанесенных производителем на пластины «OpenArray». С использованием робота для нанесения образцов «OpenArray AccuFill System», на пластины «OpenArray» наносилась реакционная смесь, содержащая смесь для генотипирования TaqMan® OpenArray® Genotyping Master Mix, деионизованная вода и образцы ДНК [12]. Термоциклирование пластин «OpenArray» проводили по следующей программе: 950С – 600 с – 1 цикл; (920С – 15 с, 600С – 60 с) – 40 циклов. Анализ данных ПЦР-РВ проводили с использованием специализированного программного обеспечения «НОМЕ Genotyper».

Экспрессию гена Oprm1 в спинном мозге крыс, спустя сутки после введения n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида, оценивали также методом ПЦР-РВ, по отношению к гену-рефери 18S рРНК на амплификаторе «7900 HT Fast Real-Time PCR System», Applied Biosystems (США), с использованием коммерческой тест-системы Applied Biosystems (Rn01430371_m1). Термоциклирование осуществляли по следующей программе: 50°С – 120 сек. – 1 цикл; 95°С – 600 сек. – 1 цикл; (95°С – 15 сек., 60°С – 60 сек.) – 45 циклов. Анализ данных проводили с использованием программы RQ Manager v.1.2.1 [13].

Для определения относительного количества кДНК, соответствующего относительному количеству мРНК в анализируемом образце, использовали разведения пулированных исследуемых образцов, при помощи которых осуществлялось построение калибровочных кривых. Показатель уровня экспрессии гена определяли относительно гена-рефери 18s рРНК по следующей формуле:

$$УЭ = \frac{\text{количество мРНК определяемого гена}}{\text{количество мРНК определяемого гена}} * 100\%,$$

в которой УЭ – относительный уровень экспрессии гена [14].

Статистическую обработку результатов производили с использованием программы Statistica 8.0. Для сравнения уровней экспрессии при носительстве различных генотипов использовали критерий Крускала-Уоллиса. Для попарного (множественного) сравнения генотипов использовали критерий Данна. Результаты представляли в виде Median 25%-75%.

Результаты и обсуждение. На основании информационно-теоретического поиска для анализа отобраны 6 полиморфных вариантов гена Oprm: rs8174389, rs105312806, rs197580673, rs199420908, rs105551578, rs105958511. Два из которых расположены в экзоне (кодирующей области гена: cds-synon и missense мутации), 3 в интроне (не кодирующей части гена) и 1 в 3'- области гена [5]. Анализ образцов ДНК, выделенных из

крови белых крыс, позволил выявить частоту полиморфных вариантов гена *Orpm1*, которые отражены в таблице 1.

Анализ результатов, представленных в таблице 1, позволил выявить наличие трех возможных генотипов (гомозиготных вариантов по «диким» и «редким» аллелям, а также гетерозиготных вариантов) только для полиморфизмов rs105551578, rs105958511, rs105312806. Для остальных исследованных полиморфизмов (rs8174389, rs197580673 и rs199420908) выявлено наличие только двух генотипов (гомозиготных вариантов по «диким» аллелям и гетерозиготных вариантов). Такое распределение может объясняться малой частотой «редких» аллелей в популяции крыс.

На следующем этапе работы, с использованием метода ПЦР-РВ, был проведен анализ УЭ гена *Orpm1* в спинном и головном мозге крыс после воздействия *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида. Для определения изменчивости УЭ гена *Orpm1* у лабораторных животных с различными генотипами, были применены значения порогового цикла амплификации для гена-мишени (*Orpm1*) и гена-рефери (18s рРНК). С помощью математических преобразований [14] полученные данные переведены в относительные уровни экспрессии для носителей каждого из трех генотипов.

При проведении статистического анализа выявлена ассоциация двух полиморфных вариантов гена *Orpm1* крыс (rs105312806 и rs105958511) с его УЭ в спинном мозге у опытных (спустя 24 часа после введения препарата) животных. Результаты представлены в таблице 2.

Статистически значимых ассоциаций полиморфизмов исследуемого гена с его УЭ в головном мозге выявлено не было.

Стоит отметить, что при анализе УЭ гена *Orpm1* в спинном мозге у интактных животных статистически значимой ассоциации аллельных вариантов с УЭ не выявлено. Однако обнаружено, что введение *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в дозе 1 ЛД₁₆ приводит к снижению УЭ в спинном мозге у опытных животных, по сравнению с интактными. Значения УЭ гена *Orpm1* в спинном мозге у интактных и опытных крыс в зависимости от генотипа, представлены на рисунке 1.

Анализ результатов, представленных в таблице 2 и на рисунке 1, свидетельствует о наличии ассоциации генотипов двух исследованных полиморфизмов гена *Orpm1* с его УЭ в спинном мозге лабораторных животных спустя сутки после введения *n*-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида. Так, у опытных животных с генотипом GG (rs105312806) УЭ гена *Orpm1* был в 9 раз выше, по сравнению с животными с генотипом AA (при $p=0,003$). Различий в УЭ между животными с гетерозиготным генотипом GA и гомозиготным генотипом AA, а также гетерозиготным генотипом GA и гомозиготным генотипом GG для rs105312806 выявлено не было (при $p=0,213$ и $p=1,000$, соответственно). Схожие изменения были выявлены для полиморфизма rs105958511. Было показано, что у опытных животных с генотипом TT УЭ гена *Orpm1* был значимо в 6,8 раз выше, по сравнению с животными с генотипом AA (при $p=0,002$). Крысы-носители гетерозиготного генотипа TA и гомозиготного генотипа AA, а также гетерозиготного генотипа TA и гомозиготного генотипа TT не характеризовались значимыми различиями по данному показателю (при $p=0,178$ и $p=0,712$, соответственно).

Результаты изучения УЭ гена *Orpm1* от его полиморфизма у животных при воздействии опи-

Таблица 1

Частота вариантов гена *Orpm1* в исследованной группе крыс

№ п/п	Генетический вариант	Количество животных с различными генотипами, N (%)					
		Гомозигота по «дикому» аллелю		Гетерозигота		Гомозигота по «редкому» аллелю	
1	G>A (rs8174389)	GG	48 (96,0)	GA	2 (4,0)	AA	0 (0,0)
2	G>A (rs105312806)	GG	19 (38,0)	GA	16 (32,0)	AA	15 (30,0)
3	G>A (rs197580673)	GG	48 (96,0)	GA	2 (4,0)	AA	0 (0,0)
4	C>T (rs199420908)	CC	48 (96,0)	GA	2 (4,0)	AA	0 (0,0)
5	A>C (rs105551578)	AA	19 (38,0)	AC	22 (44,0)	CC	9 (18,0)
6	T>A(rs105958511)	TT	17 (34,0)	TA	20 (40,0)	AA	13 (26,0)

Примечание: в скобках указана частота встречаемости генотипов, %.

Таблица 2

Уровень экспрессии гена *Orpm1* в спинном мозге у интактных и опытных крыс в зависимости от генотипа, Me (25; 75 percentile)

Полиморфизм	Гено тип	УЭ гена <i>Orpm1</i> , %		Достоверные различия *
		Интактные	Опытные	
rs105312806 (G>A)	GG	5840,67 (1608,93-10267,70)	1394,57 (814,83-1596,68) *	AA<GG (при p=0,003)
	GA	3965,15 (2565,31-4319,22)	1075,87 (862,78-1483,31)	
	AA	1885,06 (1776,73-6820,49)	149,24 (101,83-524,96) *	
rs105958511 (T>A)	TT	8755,18 (2926,15-12267,70)	1394,57 (814,83-1596,88) *	AA<TT (при p=0,002)
	TA	3779,46 (1786,65-4319,22)	965,41 (275,39-1453,47)	
	AA	1885,06 (1776,73-6820,49)	205,07 (78,27-641,30) *	

Примечание: * достоверные различия УЭ гена *Orpm1* между опытными животными с различными генотипами

оидных анальгетиков подтверждаются аналогичными и у человека. Так, при исследовании посмертных образцов головного мозга опиоидных наркоманов, показана связь аллельного варианта 118G (rs1799971A/G) с уменьшением экспрессии гена [15].

Проведенное исследование продемонстрировало статистически значимую (p<0,05) ассоциацию генотипов двух полиморфизмов rs105312806 (A/G) и rs105958511 (A/T) с УЭ гена *Orpm1* в спинном мозге лабораторных животных после воздействия n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида в дозе 1 ЛД₁₆. Крысы, носители гомозиготного генотипа AA (как по первому, так и второму полиморфизму), обладали более низким уровнем

экспрессии гена, в сравнении с носителями гомозиготных генотипов GG и TT, соответственно. Таким образом, можно предположить, что крысы с различными генотипами по данным полиморфизмам в разной степени будут проявлять чувствительность к токсическим эффектам АОР.

Заключение. Проведенные исследования показали наличие генетического разнообразия по 3 полиморфным маркерам в гене *Orpm1* крыс (rs105312806, rs105958511 и rs10551578) из 6 исследованных. Выявлено, что УЭ гена *Orpm1* снижается после воздействия n-(1-фенэтил-4-пиперидил)-пропионанилида, а также широко варьирует в анализируемой выборке опытных животных

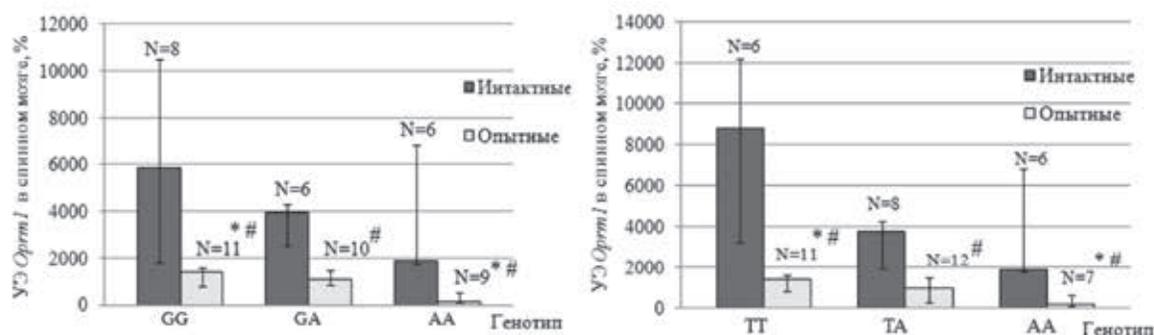


Рис. 1. Уровень экспрессии гена *Orpm1* в спинном мозге у «интактных» и «опытных» крыс в зависимости от генотипов G>A (rs105312806) и T>A (rs105958511), Me (25; 75 percentile)

Примечание: * статистически значимые различия УЭ гена *Orpm1* между опытными животными с гомозиготными генотипами по «диким» и «редким» аллелям; # - статистически значимые различия группы опытных животных от группы интактных животных; N-количество животных в группе.

с различными генотипами (rs105312806 (A/G) и rs105958511 (A/T)).

Наличие полиморфизма в гене *Oprm1* может привести к изменению уровня его экспрессии и, предположительно, к индивидуальной клинической картине после применения агонистов опиоидных рецепторов, зависимой от генотипа. Полученные результаты демонстрируют перспективность исследований в области изучения

полиморфных вариантов и экспрессии целевых генов и позволят спрогнозировать развитие индивидуальной, генетически детерминированной клинической картины, обусловленной воздействием наркотических анальгетиков с целью подбора оптимальных доз и схем терапии, а также в качестве дополнительных критериев при прогнозировании развития возможных побочных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диагностика, лечение психических и поведенческих расстройств, вызванных употреблением опиоидов. Клиническое руководство. Бишкек. 2012.
2. Каркищенко Н. Н. Альтернативы биомедицины. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. т. М.: ВПК; 2007.
3. Зайцев С.В., Ярыгин К.Н., Варфоломеев С.Д. Наркомания. Нейропептид-морфиновые рецепторы. М.: Издательство МГУ; 1993.
4. Minami M., Saton M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 1995; 23: 121-45.
5. dbSNP, a database for gene polymorphisms developed by the National Center for Biotechnology Information and the National Human Genome Research Institute. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>
6. Opioid Gene Search Result. Available at: <http://www.Rat Genome Database.com/>.
7. Женило В. М., Махарин О. А. Влияние полиморфизма гена OPRM1 118A/G на перцепцию боли и фармакодинамику наркотических анальгетиков. *Общая реаниматология.* 2014; 1: 58 -
8. Fukuda K. et al. Association between OPRM1 gene polymorphisms and fentanyl sensitivity in patients undergoing painful cosmetic surgery. *Pain.* 2009; 147 (1-3): 194-2
9. Махарин, О.А., Женило В. М., Makliakov Iu.S. The Influence of Gene Polymorphism OPRM1 118A/G on the complications of total intravenous anesthesia in the early postoperative period: Materials of the V International Scientific and Practical Conference «Actual problems of biology, nanotechnology and medicine». Rostov-on-Don; 2013; 234 - 35. (in Russian)
10. Kasai S., Ikeda K. Pharmacogenomics of the human μ -opioid receptor. *Pharmacogenomics.* 2011; 12: 1305-20.
11. Walter C., Lötsch J. Meta-analysis of the relevance of the OPRM1 118A>G genetic variant for pain treatment. *Pain.* 2009; 146 (3): 270-75.
12. TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide. 20Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf
13. Relative Quantitation Using Comparative Ct Getting Started Guide for the 7900HT Fast System.
14. Мисюрин В.А. Исследование особенностей экспрессии и распространенности раково-тестикулярных генов: Дис. ... канд биол наук. М.; 2014.
15. Oertel B.G., Doehring A., Roskam B., Kettner M., Hackmann N., Ferreiros N., Schmidt P.H., Lötsch J. Genetic_epigenetic interaction modulates m-opioid receptor regulation. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21 (21): 4751-60.
12. TaqMan® OpenArray® Genotyping. Getting Started Guide. 20Available at: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_058198.pdf
13. Relative Quantitation Using Comparative Ct Getting Started Guide for the 7900HT Fast System.
14. Misiurin V.A. Investigation of the features of expression and prevalence of testicular cancer-gene: Dis. ...Candidate Biol of Sciences.M.; 2014. (in Russian)
15. Oertel B.G., Doehring A., Roskam B., Kettner M., Hackmann N., Ferreiros N., Schmidt P.H., Lötsch J. Genetic_epigenetic interaction modulates m-opioid receptor regulation. *Hum. Mol. Genet.* 2012; 21 (21): 4751-60.

I.S. Berdinskih¹, N.S. Osechkina¹, A.V. Babkin¹, A.S. Nikiforov¹, G.V. Nazarov¹, V.N. Bykov¹, M.B. Ivanov²

GENETIC FACTORS DEFINING DIFFERENT EXPRESSION LEVELS OF OPRM1 GENE IN RATS AFTER EXPOSURE TO N-(1-PHENETHYL-4-PIPERIDYL) PROPIONANILIDE

¹Scientific Research Test Institute of Military Medicine, Medical Military Academy, 195043, Saint-Petersburg, Russian Federation

²Institute of the Toxicology, FMBA of Russia, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

Genetic specificities determining different expression levels of OPRM1 gene in white nonlinear rats were investigated after exposure to n-(1-phenethyl-4-piperidyl) propion anilide at the 1 LD₁₆ dose. The distribution of genotypes of six polymorphic *Oprm1* gene variants in rats: rs8174389, rs105312806, rs197580673, rs199420908, rs105551578, rs105958511 were studied. These variants may condition the sensitivity of animals to exposure to opioid receptors agonists. A genetic diversity was revealed in allelic versions of three polymorphisms (rs105312806, rs105958511, rs105551578). The analysis of experimental data showed a statistically significant association ($p < 0,05$) of AA genotype in rs105312806 polymorphism and AA genotype in rs105958511 polymorphism with a more lower level of *Oprm1* gene expression in rats spinal cord 24 hours after exposure to n-(1-phenethyl-4-piperidyl) propionanilide in comparison with animals with TT and GG genotypes accordingly.

Keywords: gene polymorphism, gene *Oprm1*, expression, n-(1-phenethyl-4-piperidyl) propionanilide

Переработанный материал поступил в редакцию 26.05.2015 г.