

Сорокина В.В.,  
канд. мед. наук, доцент  
Омская государственная  
медицинская академия,  
Россия

Участник конференции,  
Национального первенства  
по научной аналитике

## СУДЕБНО-МЕДИЦИНСКАЯ ОЦЕНКА СЛУЧАЕВ ОТРАВЛЕНИЯ ПРИ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ ОПИАТНЫХ НАРКОТИКОВ В КРОВИ

*Работа посвящена оценке случаев отравления опиоидными наркотиками при различных концентрациях морфина в крови от малых и сверхмалых (до 0,5 мг/л) до обычных токсических концентраций (1–4 мг/л). Установлено, что в случаях малых посмертных концентраций морфина в крови (до 0,5 мг/л) при молекулярно-генетическом исследовании выявляются, как правило, мутантные аллели CYP2D6\*3\*4; CYP2C19\*2\*3. В случаях обнаружения в крови трупа токсических концентраций обычного значения (1–4 мг/л) выявляются не мутантные аллели CYP2D6\*; CYP2C19\*. Это позволяет давать оценку случаев смерти при малых концентрациях, как генетически не устойчивых к введению различных форм морфина (героин, морфина гидрохлорид).*

*Дана рекомендация исследования генетического полиморфизма CYP2D6\*3\*4; CYP2C19\*2\*3 перед медицинским применением наркотических анальгетиков.*

**Ключевые слова:** CYP2D6; CYP2C19, генетический полиморфизм, острое отравление, морфин.

*Work is dedicated to estimation of the events of the poisoning opioid drug under different concentration morphine in shelters from small and supersmall (before 0,5 mg/l) before usual toxicological concentration (1–4 mg/l). It is installed that in events small posthumous concentration morphine in shelters (before 0,5 mg/l) under molecular-genetic study are revealed, as a rule, mutant's alleles CYP2D6\*3\*4; CYP2C19\*2\*3. In events of the finding in shelters of the dead body toxicological concentration of usual importance (1–4 mg/l) are revealed not mutant's alleles CYP2D6\*; CYP2C19\*. This allows to give the estimation of the events to deaths under small concentration, as genetic not firm to entering the different forms morphine (the heroin, morphine hydrochloridum).*

*Recommendation of the study genetic polymorfism CYP2D6\*3\*4 is given; CYP2C19\*2\*3 before medical using narcotic analgetic's.*

**Keywords:** CYP2D6; CYP2C19, genetic polymorfism, sharp poisoning, morphine.

**Ш**ирокая распространенность острых отравлений опиоидными наркотиками (героин, морфин и т.д.), а также значительное число в популяции населения РФ лиц, систематически употребляющих опиоидные наркотики, требует специальных подходов к оценке токсического действия опиатов. Широкое распространение в нашей стране метода количественного определения опиатов в крови показало, что в экспертной практике встречаются как случаи смерти при концентрации морфина до 0,5 мг/л, так и в интервале – 2–4 мг/л [4, 5, 6]. При этом, у живых лиц в крови встречаются самые разнообразные концентрации морфина от следовых и малых до 2–3 мг/л [2, 4]. Это позволяет предположить, что индивидуальная переносимость морфина и риск ущерба здоровью в значительной мере зависит от степени активности ферментов метаболизма ксенобиотиков и полиморфизма генов, кодирующих эти ферменты.

Это в свою очередь требует определенных оценок, без которых смерть от отравления героином при концентрации в крови 0,5 мг/л и в другом случае 3,5 мг/л при одной и той же непосредственной причине смерти – острой дыхательной недостаточности, без специальных исследований выглядит неубедительно. В зависимости от скорости метаболизма ксенобиотиков и лекарственных средств, в популяции населения выделяют следующие группы:

1. Распространенные (активные) метаболизаторы, имеющие нормальный ген того или иного фермента метаболизма.

2. Медленные метаболизаторы – носители мутаций гена того или иного фермента метаболизма, приводящих либо к синтезу дефектного фермента, либо вообще к отсутствию синтеза определенного фермента, результатом чего является снижение ферментативной активности или даже ее отсутствие по конкретному субстрату.

3. Сверхактивные или быстрые метаболизаторы – носители мутаций гена того или иного фермента метаболизма, приводящих к синтезу фермента с высокой метаболизирующей активностью [1].

Гены, кодирующие ферменты, которые метаболизируют ксенобиотики, характеризуются значительным полиморфизмом, и наличие делеций или «медленных» аллелей может приводить к дисбалансу процессов детоксикации [8, 9].

CYP2D6; CYP2C19 – изоферменты первой фазы метаболизма ксенобиотиков морфологическим субстратом для которых, наряду с другими ксенобиотиками являются алкалоиды опия – морфин, кодеин [1]. Наличие «медленных» аллелей в генах, кодирующих эти изоферменты, приводит либо к отсутствию синтеза этих ферментов или синтезу ферментов с низкой активностью.

**Целью работы** является создание алгоритма исследования и судебно-медицинской оценки случаев отравлений опиатами при малых и сверхмалых концентрациях морфина в крови.

**Материалы и методы исследования:**

Работа основана на результатах анализа наблюдений случаев смерти лиц, погибших с установленными данными употребления наркотических веществ. Проведено аутопсийное исследование 189 трупов лиц, погибших в связи с употреблением наркотиков за период 2005-2007 гг. Исследование трупов проводилось на базе ГУЗООБСМЭ.

Сведения об имевшейся наркотической зависимости в 35 наблюдениях были получены из амбулаторных карт, в 48 случаях в беседе с родственниками и близкими товарищами умерших, а также из материалов уголовных дел и протоколов осмотра трупа на месте происшествия.

При исследовании трупов на длительное использование наркотиков указывали: следы от внутривенных инъекций различной давности 83 наблюдения – 93%, фиброзное очаговое утолщение стенок подкожных вен 39 наблюдений – 43,8%, положительный результат количественного определения концентрации морфина в крови, 174 наблюдения – 83,1%

Из всего массива случаев нами была выделена группа лиц количест-

вом 130 человек давность наступления смерти, которых на момент осмотра трупа в морге не превышала 12 часов. Также была сформирована группа контроля – субъекты до 35 лет погибшие в результате насильственной смерти, без признаков употребления наркотических веществ внутривенно – 100 человек, давность наступления смерти которых, на момент осмотра трупа в морге также не превышала 12 часов. Проводился забор венозной крови (4-5 мл) с антикоагулянтом и последующим получением взвеси лейкоцитов, из которой выделяли ДНК методом перхлоратной экстракции с этанольным осаждением [7]. Исследование полиморфизма генов изоферментов цитохрома P450, «медленных» мутантных аллелей CYP 2D6\*3\*4; CYP2C19\*2\*3 [8] проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПДРФ анализ).

Использованы олигонуклеотидные праймеры синтезированные в институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (г.Новосибирск). Структуры олигонуклеотидных праймеров приведены в таблице (табл. 1).

Аmplификацию проводили в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl (рН 8,9), 50 мМ КСl, 1,7 мМ MgCl, 0,05% Tween 20, с добавлением 0,2 мМ-ого раствора dNTP, 0,5 мк М-го раствора праймеров, 20 нг ДНК и 1,0 ед. акт. ДНК-полимеразы.

Реакционную смесь в объеме 20 мкл покрывали 40мкл минерального масла. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Москва).

Анализ рестрикционных смесей проводили с помощью электрофореза в 3%-м агарозном геле с бромистым этидием.

Результаты исследований были статистически обработаны при помощи углового преобразования Фишера и  $\chi^2$ . Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение**

При исследовании полиморфных вариантов генов CYP 2D6\*3\*4\*6 для удобства анализа, а так же поскольку 6 аллель встречалась редко, полиморфизм гена генов CYP 2D6, мы описывали с учетом только аллели 3 и 4. Мы получили 6 групп с генотипами 1/3, 1/1 и 3/3 соответственно по 3 аллели и 1/1, 1/4 и 4/4 по 4 аллели. После этого мы вычислили частоту встречаемости данных генотипов среди исследуемых лиц и в группе контроля, а так же частоту встречаемости аллелей соответственно. Достоверный уровень статистической значимости различия был получен при исследовании CYP 2D6\*3, аллель 3/3 (табл. 2). По 4 аллели достоверный уровень статистической значимости различия выявлен не был, хотя в группе лиц, погибших в связи с употреблением наркотиков, доля наблюдений с генотипом 4/4 возрастала.

**Таблица 1**

**Структуры олигонуклеотидных праймеров**

Ген	Мутация	U	R
CYP2D6	CYP2D6*3	GGATGAGCTGCTAACTGAGCCC	CCCAAACCTCCAATTCTGC
CYP2D6	CYP2D6*4*6	GGCAAGAAGTCGCTGGACCAG	
CYP2Ñ19	CYP2C19*3	GGATAGCTGCTAACTGAGCCC	CCCAAAACCTCCAATTCTGC
CYP2Ñ19	CYP2C19*2	GGCAAGAAGTCGCTGGACCAG	TTACCTTCTCCATTTTGATCCG

**Таблица 2**

**Частота встречаемости генотипов гена CYP2D6\*3**

Генотип	Лица, погибшие при употреблении наркотиков $\sum 118$		Контроль $\sum 100$		Уровень статистической значимости различия
	Количество (шт.)	Частота встречаемости	Количество (шт.)	Частота встречаемости	
1/1	9	0,08	46	0,46	$P < 0,05$
1/3	86	0,81	48	0,48	$P > 0,05$
3/3	23	0,21	6	0,06	$P < 0,05$

Среди исследований генотипов CYP2C19\*2\*3, которое проводилось таким же образом, распределение генотипов и аллелей в исследуемых группах и группе контроля не достигло статистической значимости различия, но количество гомозиготных (медленных) аллелей 2/2 и 3/3 в исследуемой группе лиц погибших в связи с употреблением морфина возросло.

В группе гомозиготных носителей медленных мутантных аллелей CYP2D6 и CYP2C19 были идентифицированы лица, возраст которых составлял от 16 до 20 лет, стаж употребления наркотиков от 1 инъекции до 1 года. При этом, проанализировав результаты количественного определения наркотика в крови этой группы наблюдений, мы установили, что концентрация морфина в крови трупов колебалась от следовых количеств до 0,5 мг/л (табл. 3).

Распространенные метаболизаторы погибают при средних и высоких концентрациях морфина в крови (1-4,0 мг/л).

После этого мы проанализировали причины смерти лиц погибших в связи с употреблением морфина среди носителей гомозиготных медленных мутантных аллелей CYP 2D6 и CYP 2C19. Непосредственной причиной смерти медленных метаболизаторов явилась острая дыхательная недостаточность. При этом на секции, мы наблюдали: признаки острой эмфиземы и дистелектазов в легких, субплевральные кровоизлияния, певрискулярные кровоизлияния в стволе головного мозга, острое венозное полнокровие внутренних органов. Следовательно, мы можем говорить о так называемой «смерти на игле» при введении сравнительно небольшой дозы наркотического вещества, которая для них явилась смертельной.

Определяющим в морфогенезе острого отравления опиатами является полиморфизм генов, контролирующих скорость первой фазы метаболизма ксенобиотиков. Медленные метаболизаторы (гомозиготы по мутантным аллелям CYP 2D6\*3\*4; CYP2C19\*2\*3) погибают при сверхмалых концентрациях морфина в крови (до 0,5 мг/л). Сравнительный анализ распределения аллелей и генотипов CYP2D6\*3A и CYP2D6\*4A выявил достоверные отличия между лицами, употреблявшими наркотические вещества и группой контроля.

По результатам исследования изоферментов цитохрома P450 можно полагать, что острые отравления характерны в основном в случаях, где манифестируют медленные метаболизаторы ксенобиотиков – гомозиготные носители «медленных» мутантных аллелей генов CYP2D6 и CYP 2C19.

Для оценки спорных и сложных случаев отравления сверхмалыми дозами опиатов (менее 0,5 мг/л) в крови следует помимо морфологической картины и непосредственной причины смерти исследовать генетический полиморфизм CYP 2D6\*3\*4

Таким образом, однозначно выявляются медленные метаболизаторы, которые погибают сразу после инъекции обычной и даже небольшой дозы наркотика, а распространенные и быстрые метаболизаторы, которые погибают, как правило, через несколько лет после начала употребления наркотиков.

Исходя из полученных в работе результатов, мы полагаем, что имеется реальная необходимость исследования полиморфных вариантов генов (CYP2D6\*3A и CYP2D6\*4A, CYP2C19\*2A и CYP2C19\*3A) на предмет выявления медленных метаболизаторов. Это позволит не применять с медицинскими и иными целями

анальгетики с морфинным циклом.

Учитывая тот факт, что генетическая характеристика метаболизма сохраняется в течение всей жизни необходимо доводить эту информацию (конкретные варианты CYP2D6\*3A и CYP2D6\*4A, CYP2C19\*2A и CYP2C19\*3A) до сведения пациента и отмечать в медицинской документации.

Совершенно очевидно, что эта группа лиц подвержена риску внезапной смерти при любых вариантах употребления веществ с морфинным циклом.

Геномный подход к изучению вариаций индивидуальных реакций организма на введение ксенобиотиков, в том числе и наркотических анальгетиков с морфинным циклом, позволит разработать подходы к индивидуальному дозированию препаратов, в зависимости от активности изоферментов (CYP2D6\*3A и CYP2D6\*4A, CYP2C19\*2A и CYP2C19\*3A), а также существенно снизить риск развития отравлений. При назначении наркотических анальгетиков с морфинным циклом необходимо учитывать, что полиморфизм изофермента 2D6, ответствен за метаболизм не только наркотических анальгетиков, но и многих других лекарственных средств, которые, в свою очередь, могут индуцировать или ингибировать его действие, тем самым, ускоряя или подавляя метаболизм. Данное обстоятельство может привести к кумуляции лекарственного препарата и развитию нежелательных эффектов и передозировки. Большим преимуществом генотипирования, как метода индивидуализации фармакотерапии вообще и наркотическими анальгетиками, в частности, является постоянство полученных результатов в течение всей жизни пациента и малая инвазивность метода.

Таблица 3

**Абсолютные показатели распределения концентрации наркотика в крови трупа среди гомозиготных аллелей CYP 2D6\*3\*4 ; CYP2C19\*2\*3**

	Гомозиготные аллели CYP2D6*3*4		Гомозиготные аллели CYP2C19*2*3	
	3/3	4/4	3/3	2/2
Концентрация наркотика в крови трупа < 0,5 мг/л	22	8	1	6
Концентрация наркотика в крови > 0,5 мг/л	1	1	–	1

**Литература:**

1. Пальцев М.А. Введение в молекулярную медицину. – М. Медицина 2004. – с. 196-199.

2. Пиголкин Ю.И. Морфологические изменения внутренних органов при опийной наркомании / Ю.И. Пиголкин, Д.В. Богомолов // Архив патологии. – 2002. – Т. 64, № 1. – С. 3-5.

3. Тимофеев И.В. Патология лечения. Руководство для врачей. – СПб: Северо-Запад, 1999. – С. 76-78.

4. Сорокина В. В. Героиновые нефропатии // «НАРКОЛОГИЯ». – №10 (70). – Москва-2007. – С. 41-44.

5. Шигеев С.В., Жаров В.В. Судебно-медицинское диагностическое значение содержания морфина в крови и моче // Судебно-медицинская экспертиза. – 2005. – № 5. – С. 39-42.

6. Шигеев С.В. Судебно-медицинская оценка острых отравлений опиатами // Проблемы экспертизы в медицине. – 2005. – № 1. – С. 25-26.

7. Johns M., Paulus-Thomas J. Purification of human genomic DNA from whole blood using sodium perchlorate in place of phenol // Anal. Biochem. – 1989. – V. 80. – № 2. – P. 276-278.

8. Lapple F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M, and Kivisto KT (2003) Differential expression and function of CYP2C19 isoforms in human intestine and liver. *Pharmacogenetics* 13:565–575.



International multilingual social network  
for scientists and intellectuals.

International intellectual portal «PlatoNick» is a multilingual, open resource intended to facilitate the organization of multifaceted communication of scientists and intellectuals, promulgate their authoritative expert conclusions and consultations. «Platonick» ensures familiarization of wide international public with works of representatives of scientific and pedagogic community. An innovation news line will also be presented on the «Platonick» portal.

Possibility of the informal communication with colleagues from various countries;

Demonstration and recognition of creative potential;

Promulgation and presentation of author's scientific works and artworks of various formats for everyone interested to review.



<http://platonick.com>