© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616.831-005.1/.4-037-092:[612.6.05:577.21

ПОЛИМОРФИЗМ Val66Met *BDNF* У БОЛЬНЫХ С ВЫСОКИМ РИСКОМ ЛЕТАЛЬНОСТИ В РЕЗУЛЬТАТЕ ИНСУЛЬТА И ТЯЖЕЛОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

В.М. Шкловский[1, 2], академик РАО, доктор психологических наук, профессор, **В.Б. Вильянов**[1], доктор медицинских наук, профессор, **Ю.А. Фукалов**[2], **А.Ю. Ременник**[2], кандидат медицинских наук, **Л.А. Скипетрова**[2], **Г.Н. Кобозев**[1], кандидат медицинских наук, **И.Ю. Орлов**[2], **А.Г. Петрушевский**[2], **А.В. Кудряшов**[2], **М.Е. Кокорева**[2]

[1]*Московский НИИ психиатрии МЗ РФ,*

[2]*Центр патологии речи и нейрореабилитации, Москва*

E-mail: vilianov1@mail.ru

Исследован полиморфизм Val66Met гена BDNF у больных с высоким риском летальности в результате инсульта или тяжелой черепно-мозговой травмы. Частота генотипа ValVal превышала аналогичный показатель в контрольной группе в общей выборке испытуемых (75,5 и 63,6%; χ^2=4,63; df=1; p=0,03). Частота аллеля Val у пациентов с последствиями тяжелой черепно-мозговой травмы составляла 90,0%, у перенесших геморрагический инсульт – 87,1%, ишемический – 85,4%; при объединении 2 последних групп больных различия по сравнению с контролем были близки к значимым (χ^2=3,67; df=1; p=0,055). В этой объединенной группе обнаружены различия частоты встречаемости генотипов по сравнению с контрольной группой (χ^2=3,88; df=1; p=0,049). При генотипе Met$^-$ средний размер очага поражения головного мозга в результате ишемического инсульта составлял 79,01 см^3, при Met$^+$ – 108,85 (p=0,13). Возможно, аллель Val полиморфизма Val66Met BDNF является фактором выживаемости больных при ишемическом и геморрагическом инсультах и тяжелой черепно-мозговой травме.

Ключевые слова: *инсульт, черепно-мозговая травма, гены, мозговой нейротрофический фактор*

Val66Met BDNF POLYMORPHISM IN PATIENTS WITH A HIGH RISK OF MORTALITY DUE TO STROKE AND SEVERE TRAUMATIC BRAIN INJURY

V.M. Shklovsky[1, 2], V.B. Vilyanov[1], Yu.A. Fukalov[2], A.Yu. Remennik[2], L.A. Skipetrova[2], G.N. Kobozev[1, 2], I.Yu. Orlov[2], A.G. Petruschevsky[2], A.V. Kudryashov[2], M.E. Kokoreva[2]

[1]*Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russian Federation;*

[2]*Speech Pathology and Neurorehabilitation Center, Moscow, Russian Federation*

We have studied BDNF gene Val66Met polymorphism in patients with a high risk of mortality due to stroke or severe head injury. Genotype ValVal rate was higher than that of in the control group in the total sample of subjects (75,5% and 63,6%; χ^2=4,63; df=1; p=0,03). In patients with consequences of severe head injury Val allele frequency was 90,0%, in patients with hemorrhagic stroke – 87,1%, in cases with ischemic stroke – 85,4%, in the united group of stroke patients, compared with controls, the differences were close to be significant (χ^2=3,67; df=1; p=0,055). In this united group detected differences in frequency of genotypes were similar to controls (χ^2=3,88; df=1; p=0,049). In genotype Met$^-$ cases the average size of the lesion of the brain as a result of ischemic stroke was 79,01cm^3, Met$^+$ – 108,85 (p=0,13). Val allele of Val66met BDNF polymorphism may be a factor of survival in patients with ischemic and hemorrhagic stroke and severe traumatic brain injury.

Key words: *stroke, traumatic brain injury, genes, brain-derived neurotrophic factor*

Мозговой нейротрофический фактор (brain – derived neurotrophic factor – BDNF), один из наиболее изучаемых нейротрофинов, участвующий в регуляции выживаемости, дифференцировке и поддержании функций нейронов, а также вовлеченный в возникновение долговременной потенциации, лежащей в основе клеточных механизмов памяти и обучения [10]. BDNF поддерживает рост мотонейронов, сенсорных, ганглионарных, дофаминергических, холинергических и ГАМК-ергических нейронов [7]. Ген BDNF считается геном раннего ответа, т.е. в ответ на стимул происходит быстрая инициация транскрипции этого гена [9]. Увеличение экспрессии гена BDNF регулируется глутаматом (через глутаматные рецепторы), а снижение – в основном через систему ГАМК [16].

В исследованиях по имитации ишемического инсульта на крысах показано защитное влияние BDNF на нейроны через снижение факторов локального воспаления [11, 14]. Отмечено уменьшение размера зоны ишемии мозговой ткани после предварительного введения BDNF в желудочки мозга [13]. Эти данные дают основание полагать, что BDNF противостоит механизму глутаматной эксайтотоксичности. Ген BDNF находится на хромосоме 11q13 и состоит из 5 или более экзонов. Исследования гена выявили полиморфный сайт rs 6265, обусловленный заменой гуанина на аденин, которая приводит к замещению валина (Val) на метионин (Met) в 66-м кодоне и влияет на регуляцию секреции белка BDNF [6]. С аллелем Met связывают более низкий уровень сывороточного BDNF [12], а также снижение объема кратковременной памяти, уменьшение объема гиппокампа и дорсолатеральной префронтальной коры [6, 13]. Соотношение аллелей Val/Met у психически здоровых людей оказалось очень вариабельным. Так, среди жителей Москвы и Подмосковья соотношение аллелей Val/Met составляло 0,78/0,22 [2], в японской популяции – 0,59/0,41, в итальянской – 0,7/0,3, североамериканской – 0,82/0,18 [15].

В этой связи изучение полиморфизма Val66Met BDNF у больных с последствиями ишемического, геморрагического инсультов и тяжелой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) имеет научное и практическое значение. Объединение в одном исследовании 3 указанных категорий больных обусловлено большой распространенностью этих вариантов патологии, а также схожестью патогенетических механизмов развития повреждения ЦНС. Показано, что в зоне травматической пенумбры развиваются ишемические каскады, аналогичные возникающим при ишемическом инсульте, при этом патохимические различия в особенностях развития обоих процессов крайне незначительны [8].

Целью настоящего исследования было изучение аллельного полиморфизма rs 6265 BDNF (Val66Met) у больных с последствиями тяжелой ЧМТ, ишемическим или геморрагическим инсультом. Задачи исследования включали:

1. Определение соотношения генотипов VAlVal, ValMet и MetMet в общей группе исследуемых больных.
2. Сравнительный анализ соотношения указанных параметров в группах больных с последствиями ЧМТ, ишемического или геморрагического инсульта.
3. Изучение влияния гендерного фактора на соотношение генотипов.
4. Исследование связи указанного варианта аллельного полиморфизма с размерами очагов повреждения в результате ишемического инсульта.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Под наблюдением находилось 163 больных с последствиями инсульта или тяжелой ЧМТ, получавших лечение в Центре патологии речи и нейрореабилитации (табл. 1). Критерием включения в группу исследования было наличие тяжелого ишемического или геморрагического инсульта в бассейне левой средней мозговой артерии с повреждением лобно-височной-теменной зоны коры больших полушарий, сопровождавшегося расстройствами сознания в диапазоне «сопор – кома» и повлекшее госпитализацию в течение первых 24–48 ч с момента заболевания. Уровень утраты дееспособности по модифицированной шкале Рэнкина у больных на момент обследования соответствовал II–III степени. Оценка тяжести ЧМТ, у включенных в исследование пациентов соответствовала общепринятым критериям: травматическое повреждение мозга, обусловливающее нарушение уровня сознания в пределах 3–8 баллов по шкале комы Глазго [3, 16].

У всех испытуемых были констатированы умеренные или тяжелые речевые расстройства (сенсорная и моторная афазия, смешанные формы), а также характерные для последствий органического поражения головного мозга соматоневрологические осложнения.

Материалом для генетического исследования являлась кровь пациентов, взятая из кубитальной вены. Аллельный полиморфизм определяли с помощью полимеразной цепной реакции. Для определения полиморфизма Val66Met гена BDNF были использованы олигонуклетидные

Таблица 1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБСЛЕДОВАННЫХ

Группа больных	Мужчины		Женщины		Средний возраст*, годы	Общее количество больных	
	абс.	%	абс.	%		абс.	%
Ишемический инсульт	67	75,3	22	24,7	59,2±1,7	89	54,6
Геморрагический инсульт	38	70,4	16	29,6	46,9±2,2	54	33,1
Последствия ЧМТ	15	75,0	5	25,0	32,2±4,5	20	12,3
Всего	120	73,6	43	26,4	55,1±2,9	163	100,0

* – При начале заболевания.

праймеры: 5'-GAGGCTTGACATCATTGGCT-3' и 5'-CGTGTACAAGTCTGCGTCCT-3', соответственно, выделены аллели Val и Met, генотипы ValVal, ValMet и MetMet. В группе контроля были представлены результаты генотипирования 121 психически здорового испытуемого (48 женщин и 73 мужчины; средний возраст – 29,2 года).

Магнитно-резонансную томографию проводили на томографе MAGNETOM AVANTO 1,5 T (SIEMENS). Объемы очагов поражения паренхимы головного мозга (кистозная трансформация с перифокальным глиозом) вычисляли путем суммации площадей поражения на каждом срезе (в см^2) с умножением полученного результата на коэффициент 0,65. Данный коэффициент является суммой толщины среза (5 мм) и межсрезового интервала (gap=1,5 мм). Объем очага поражения определяли только у пациентов с последствиями ишемического инсульта, поскольку у больных с ишемическим инсультом и тяжелой ЧМТ на размеры повреждения мозга зачастую оказывали влияние последующие оперативные вмешательства на головном мозге.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью критерия χ^2 для оценки ассоциированности вариантов генотипа с рассматриваемыми заболеваниями. Достоверность различий средних значений объемов очагов поражения у больных с последствиями ишемического инсульта определяли по критерию Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение распределения генотипов Val66Met BDNF в контрольной группе показало, что оно не отличалось от ожидаемого распределения Харди–Вайнберга (χ^2=0,015; p>0,05). Полученные результаты представлены в табл. 2.

Частота аллелей Val и Met в общей выборке больных значимо различалась с таковой в контрольной группе (χ^2=4,63; df=1; p=0,03).

Не обнаружено статистически значимых различий в частоте аллелей между группами больных с ишемическим и геморрагическим инсультом и при сравнении каждой из них с контролем. В объединенной группе больных с ишемическим и геморрагическим инсультом различия в частоте аллелей по сравнению с контрольными данными были близки к значимым (χ^2=3,67; df=1; p=0,055).

При расчете частоты генотипов с учетом малочисленности больных с генотипом MetMet их объединили с носителями генотипов ValMet, и таким образом, расчет производился в 2 группах Met$^-$ (ValVal) и Met$^+$ (ValMet + MetMet). Статистически значимые различия частоты генотипов по сравнению с контролем получены только в объединенной группе больных с ишемическим и геморрагическим инсультом (χ^2=3,88; df=1; p=0,049). Достоверность различий частоты аллелей и генотипов в группе больных с последствиями ЧМТ по сравнению с другими группами больных и с контролем ввиду их малочисленности не определяли.

Следует отметить, что все носители гомозиготного генотипа MetMet в основной группе относились к пациентам с последствиями ишемического инсульта. Носителей указанного генотипа было не много и в контрольной группе, но все же больше, чем среди больных. По частоте встречаемости аллеля Val лидировали больные с последствиями ЧМТ, затем – перенесшие геморрагический и ишемический инсульт.

Поскольку в нашей выборке распределение показателей объема очагов поражения у пациентов с ишемическим инсультом не соответствовало критериям нормального распределения, достоверность различия данных показателей в группах с генотипом Met$^-$ и Met$^+$ определяли по критерию Манна–Уитни. Результаты расчета представлены в табл. 3 и на рис. 1.

Результаты исследования указывают на отчетливую тенденцию к снижению размеров очагов поражения головного мозга у носителей генотипа Met$^-$ (ValVal). При исследовании гендерных различий в характере распределения проявлений ал-

Таблица 2

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМА Val66Met *BDNF* В ИССЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ

Группа больных	Аллели				Генотипы						Всего генотипов
	Val		Met		ValVal		ValMet		MetMet		
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	
Все больные	282	86,5±1,9	44	13,5±1,9	123	75,5±3,4	36	22,1±3,2	4	2,4±1,2	163
Ишемический инсульт	152	85,4±2,6	26	14,6±2,6	67	75,3±4,6	18	20,2±4,2	4	4,5±2,2	89
Геморрагический инсульт	94	87,1±3,2	14	12,9±3,2	40	74,1±5,9	14	25,9±5,9	0	0	54
ЧМТ	36	90,0	4	10,0	16	80,0	4	20,0	0	0	20
Контроль	193	79,7±2,6	49	20,3±2,6	77	63,6±4,5	39	32,2±4,4	5	4,1±1,5	121

Таблица 3

СРЕДНИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РАЗМЕРОВ ОЧАГОВ ПОРАЖЕНИЯ У БОЛЬНЫХ С ПОСЛЕДСТВИЯМИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА ПРИ ВАРИАНТАХ ГЕНОТИПА Met⁻ И Met⁺

Генотип	Средний размер очага поражения, см³	Медиана	Доверительный интервал	p
Met⁻ (n=67)	79,01	64,0	67,51 – 90,52	0,13
Met⁺ (n=22)	108,85	90,5	76,93 – 140,76	

лельного полиморфизма значимых различий не выявлено. У пациентов мужского и женского пола частота встречаемости выделенных аллелей совпадала (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

Общая летальность у больных с инсультом составила в 2001 г. 40,37% (36,6% – у мужчин и 43,4% – у женщин), причем значительно преобладала при кровоизлияниях в мозг по сравнению с его инфарктами (соответственно 61,4 и 21,8%) [1]. В настоящее время летальность при тяжелой ЧМТ составляет от 35–40% [16] до 80 % [3]. Следовательно, все включенные в настоящее исследование пациенты с последствиями инсульта и тяжелой ЧМТ относятся к категории лиц, переживших состояние высокого риска летальности (обусловленного среди прочих факторов, и генетической предиспозицией), что позволило объединить их по данному признаку в одну группу.

Тот факт, что у исследуемых нами больных наблюдалась более частая встречаемость аллеля Val, чем в контрольной группе, дает основание полагать, что накопление частоты в этой группе связано с большей летальностью от инсульта и тяжелой ЧМТ носителей аллеля Met. В пользу этого предположения свидетельствуют и меньшие размеры средних показателей объема очага поражения при генотипе ValVal, а также эпидемиологические данные о более высокой летальности при геморрагическом инсульте (в нашей выборке у больных с последствиями данного варианта сосудистой патологии отмечена более высокая встречаемость аллеля Val). Наиболее значимые различия соотношения аллелей Val/Met получены у испытуемых с последствиями перенесенной тяжелой, на грани пределов выживаемости, ЧМТ. Допустимо предположить, что здесь фактор генетической предиспозиции сыграл еще более значимую роль, чем у пациентов с инсультом. Следовательно, выявленное в исследуемых группах соотношение аллелей Val/Met полиморфизма rs 6265 BDNF отражает степень угрозы летальности при данных вариантах повреждения ЦНС. Генотип ValVal в точке полиморфизма rs 6265 гена мозгового нейротрофического фактора обеспечивает лучшую защиту от повреждения в результате ишемии, более эффективно способствует выживаемости нейронов, препятствует развитию глутаматной эксайтотоксичности. Наше исследование согласуется с представлением о том, что ген BDNF является геном раннего ответа на повреждение нейронов.

Полученные данные позволяют по-новому оценить некоторые результаты проведенного ранее исследования аллельного полиморфизма rs 6265 BDNF у больных шизофренией с ранним началом [4, 5], в котором соотношение аллелей Val/Met было соответственно 86,2 и 13,8% (в контроле – 77,5 и 22,5%). Это дало основание расценить генотип ValVal как маркер раннего начала шизофрении. Подчеркнем, что это – данные генотипирования детей, у которых заболевание началось в возрасте до 15 лет (средний возраст начала заболевания 10,5±3,7 года), сюда были включены и пациенты с ранней детской шизофренией, с дебютом процесса в возрасте до 5 лет.

В свете полученных нами данных допустимо предположить, что увеличение частоты аллеля Val при детской шизофрении может быть обусловлено его «накоплением» среди данного контингента за счет увеличения пре- и перинатальной летальности, а также летальности в первые годы жизни детей с аллелем Met и этиологически неясной пока неблагоприятной генетической предиспозицией, которая может проявляться как в форме шизофрении, так и другими вариантами патологии ЦНС. У выживших носителей аллеля Met в последующем заболевание могло быть квалифицировано и как другие формы психической

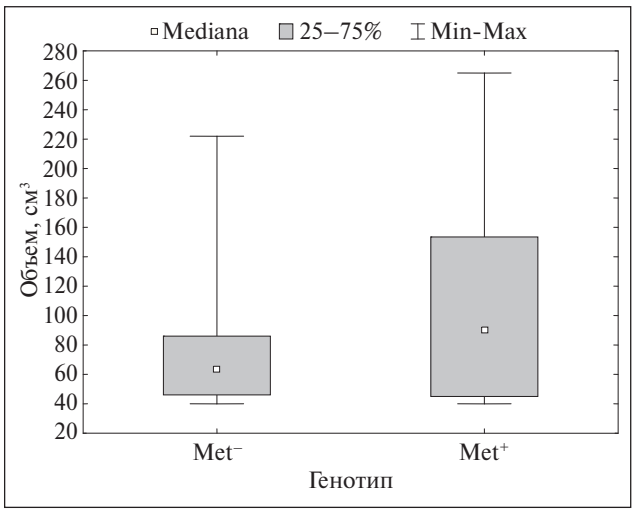

Рис. 1. *Объемы очагов поражения у больных ишемическим инсультом с различными вариантами генотипа*

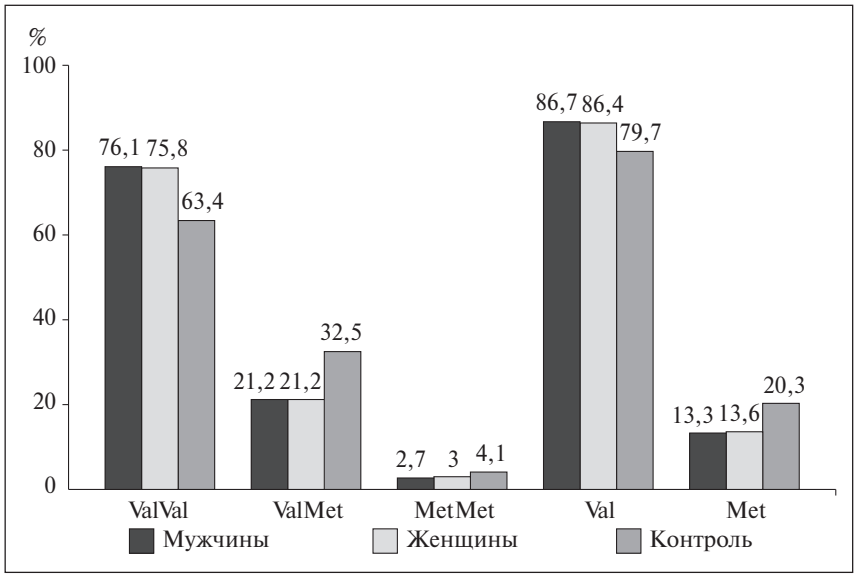

Рис. 2. *Частота встречаемости генотипов и аллелей Val и Met (%) у больных с последствиями ишемического и геморрагического инсульта с учетом гендерного фактора*

патологии, в том числе с более выраженными и ранними проявлениями когнитивного дефицита (например, олигофрения или детский церебральный паралич). В пользу этого предположения свидетельствуют более высокие показатели риска невынашивания беременности и осложнений в родах у этой группы испытуемых [4].

Проведенное исследование позволяет предположить, что аллель Val rs 6265 BDNF является фактором, обеспечивающим выживаемость больных с тяжелым органическим поражением головного мозга, а соотношение числа аллелей Val/Met в популяционном исследовании может служить сравнительным показателем силы влияния фактора летальности от различных заболеваний ЦНС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В. Эпидемиология инсульта в России // Журн. неврол. и психиатр. – (приложение «Инсульт») – 2003; 8: 4–9.
2. Голимбет В.Е. Коровайцева Г.И., Абрамова Л.И. и др. Связь полиморфного маркера Val66Met гена нейротрофического фактора головного мозга с шизофренией в русской популяции // Молекул. биол. – 2008; 42 (4): 1–6.
3. Качков И.А. В.Г., Амчеславский В.Г., Филимонов Б.А. Алгоритмы лечения тяжелой черепно-мозговой травмы в остром периоде // Consilium medicum. – 1999; 1 (2).
4. Пахомова С.А., Вильянов В.Б., Голимбет В.Е. Аллельный полиморфизм генов и клинико-анамнестические показатели больных шизофренией детского и подросткового возрастов // Сиб. вестн. психиатрии и наркологии. – 2009; 6: 52–7.
5. Пахомова С.А., Коровайцева Г.И.,. Вильянов В.Б. и др. Молекулярно-генетическое исследование шизофрении с ранним началом // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2010; 110 (2): 66–9.
6. Egan M., Kojima N., Callicott J. et al. The BDNF val66met polymorphism affects activity – dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // Cell. – 2003; 112: 257–69.
7. Henderson C. Role of neurotrophic factors in neuronal development // Curr. Opin. Neurobiol. – 1996; 6 (1): 64–70.
8. Kendell E., Swartz J., Jessel T. Principles of Neuronal Sciences. Appleton and Lange. – 2000; 1134.
9. Lindvall O., Kokaia Z., Bengzon J. et al. Neurotrophins and brain insults // Trends Neurosci. – 1994; 17 (11): 490–6.
10. Lomo T. The discovery of long-term potentiation // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. – 2003; 358 (1432): 617–20.
11. Jiang Y. Intranasalbrain-derived neurotrophic factor protect brainfrom ischemic insult via modulating local inflammation in rats // Neurescience. –2011; Jan. 13; 172: 398–405.
12. Ozan E., The effect of depression, BDNF gene val66met polymorphism and gender on serum BDNF levels // Brain Res. Bull. – 2010; Jan. 15; 81 (1): 61–5.
13. Rybakowcki J., Borkovska A., Czerski P. et al. Polimorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and performance on a cognitive test in bipolar patients // Bipolar. Disord. – 2003; 5: 468–77.
14. Schabitz W., Schwab S., Spranger M. et al. Intraventricular brain – derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. – 1997; 17 (5): 500–6.
15. Simizu E., Hashimoto K., Masaomi I. Ethnic difference of the BDNF 196G/A (val66met) polymorphism frequencies: The possibility to explain ethnic mental traits American Journal of Medical Genetics Part B // Neuropsychiatric Genetics. – 2003; 126B (1): 122–3.
16. Zafra F., Castren E., Thoenen H. et al. Interplay between glutamate and gamma aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. – 1991; 88 (22): 10037–41.