



УДК 575.17:616.831-005

Н. Н. Страмбовская

ЧАСТОТА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА НЕКОТОРЫХ РОСТКОВЫХ ФАКТОРОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА

*Читинская государственная медицинская академия,
672090, ул. Горького, 39а, тел. 8-(3022)-35-43-24, e-mail: pochta@chitgma.ru, г. Чита*

Резюме

Исследованы частоты аллелей и генотипов для 3 SNP-маркеров: BDNF (G>A), CNTF (G>A), VEGF-A (A2578C) у больных хронической ишемией мозга различной степени тяжести и здоровых наблюдаемых, соответствующих по полу и возрасту группе пациентов. Анализ частот аллелей BDNF (G>A) и VEGF-A (A2578C) у больных в сравнении со здоровыми не выявил достоверных различий. Сравнительный анализ аллелей и генотипов CNTF (G>A) показал более частое наблюдение у больных CNTF-A-аллеля ($\chi^2=5,17$; $p=0,02$) и генотипа CNTF-GA ($\chi^2=14,2$; $p=0,007$) с увеличением риска развития патологии при носительстве в 2,3 [CI 95 %: 1,46–3,73] раза, что может рассматриваться как один из факторов предрасположенности к болезни.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга, генетическая предрасположенность, генетический полиморфизм, цитокины.

N. N. Strambovskaya

GENETIC POLYMORPHISM OF THE GROWTH FACTORS IN PATIENTS WITH CHRONIC BRAIN ISCHEMIA

Chita State Medical Academy, Chita

Summary

Allele and genotype frequencies of 3 single nucleotide polymorphisms: BDNF (G>A), CNTF (G>A), VEGF-A (A2578C) were studied in the patients with chronic brain ischemia with different severity and healthy subjects matched for sex and age. The analysis of allele frequencies for BDNF (G>A) and VEGF-A (A2578C) polymorphisms in patients and controls did not reveal any significant differences. Frequency analysis showed that allele CNTF-A ($\chi^2=5,17$; $p=0,02$) and genotype CNTF-GA ($\chi^2=14,2$; $p=0,007$) was higher in the group with chronic brain ischemia compared to the controls, an increased risk of the disease in carriers 2,3 times higher [CI 95T %: 1,46–3,73] and can be considered as the predilection to the disease.

Key words: chronic brain ischemia, genetic susceptibility, genetic polymorphism, cytokines.

Хроническая ишемия мозга являющаяся следствием атеротромбогенеза и других сосудистых патологических процессов, нарушающих кровоток, сегодня все чаще формируется у лиц работоспособного возраста, а в старших возрастных группах получает тотальное распространение [2]. Адекватное кровоснабжение различных областей мозга контролируется различными ауторегуляторными механизмами, среди которых – помимо миогенных и нейрогенных компонентов системе химической регуляции принадлежит основное место. С этой точки зрения рассмотрение роли отдельных

групп химических регуляторов мозга, в том числе и в условиях ишемических нейропатологий представляет попытку выяснения причинно-следственных отношений этих расстройств [1, 6].

В последние десятилетия активно предпринимаются усилия для выявления генетических предикторов цереброваскулярных заболеваний. Большое количество работ посвящено генетическим маркерам предрасположенности к артериальной гипертензии, дислипемии и атерогенезу, обозначены этнические аспекты носительства. Однако роль полиморфизма ростковых

факторов – факторов химической регуляции в развитии и патогенезе хронических нейроциркуляторных нарушений изучена не достаточно полно.

Цель работы – изучение частот генотипов и аллелей полиморфизма генов ростковых факторов: BDNF (G>A), CNTF (G>A), VEGF-A (A2578C) у больных хронической ишемией мозга, осложненной когнитивной дисфункцией и без нее, а также у резидентов популяции Забайкальского края, не имеющих признаков цереброваскулярной патологии.

Материалы и методы

Первую клиническую группу составили 101 (62 женщин и 39 мужчин) больной в возрасте $58,3 \pm 9,2$ лет, имеющих жалобы и объективные признаки хронической ишемии мозга II стадии без признаков декомпенсации. Вторую клиническую группу составили 209 (137 женщин и 72 мужчин) больных в возрасте $65,8 \pm 9,7$ лет ($p > 0,05$), имеющих жалобы и объективные признаки хронической ишемии мозга III стадии и когнитивными нарушениями степени деменции. В качестве критериев включения в первую и вторую клинические группы, а также для установления степени когнитивных нарушений использовались оценочные шкалы: Natchinski (>4 баллов), MMSE (10–24 баллов включительно), тест рисования часов (менее 10 баллов)); отрицательный результат при оценке депрессии по шкале М. Гамильтон (<15 баллов). Сосудистый характер поражения подтверждался нейровизуализационно, а также шкалой ишемии NINDS-AIREN. В качестве фоновой патологии пациенты обеих групп в равной степени имели артериальную гипертензию (92,3%), изменения со стороны стратегических для мозгового кровотока сосудов (атеросклероз, патологическая извитость и т.д. – 81,2%), дислипидемию (79,4%), сахарный диабет II типа (23,3%). Следует отметить, что наблюдаемые имели равный стаж заболевания (по объективным и субъективным признакам), однако степень нарастания очаговой и когнитивной симптоматики была более значительна во второй группе исследования.

Контрольную группу составили 202 неродственных резидента открытой популяции Забайкальского края (129 женщин, 73 мужчин) в возрасте $51,6 \pm 11,7$ лет ($p > 0,05$), проживающих в городе Чита, не имеющих на момент исследования объективных признаков сосудистой, в том числе и цереброваскулярной патологии.

Методом исследования послужила полимеразная цепная реакция с детекцией продукта амплификации в режиме реального времени (PCR-rt) на геномной ДНК лейкоцитов периферической крови.

Для оценки соответствия распределений генотипов ожидаемым значениям при равновесии Харди-Вайнберга и для сравнения распределений частот генотипов и аллелей в двух субпопуляциях использовали критерий χ^2 с поправкой Йетеса. Об ассоциации аллелей или генотипов с предрасположенностью к изучаемой патологии судили по величине относительного риска заболевания (ОР). Границы 95% доверительного интервала (CI) вычисляли методом В. Woolf. Значения уровня $p < 0,05$ рассматривались как статистически значимые. Статистическая обработка данных проводи-

лась с использованием программного пакета Statistica 6.1 (StatSoft, USA).

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО ЧГМА, протокол № 2 от 06.11.2009 г.

Результаты и обсуждение

В ходе работы обнаружены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии с подчинением равновесию Харби-Вайнберга при сравнении наблюдаемых и ожидаемых частот. В таблице 1 и 2 представлены результаты анализа распределения аллелей (доли) и генотипов (%) изучаемых SNP-полиморфизмов в наблюдаемых группах. Ростовые и нейротрофические факторы являются полипептидами, которые, воздействуя на различные типы клеток, участвуют в реализации их функций. В нашем исследовании с учетом биологической роли и потенциального влияния на развитие и течение цереброваскулярной патологии мы остановились на изучении полиморфизма генов трех ростковых факторов: BDNF (G>A), CNTF (G>A), VEGF-A (A2578C).

BDNF принадлежит к семейству нейротрофинов и действует через общий для всех нейротрофинов p75NTR рецептор (p75 neurotrophin receptor), а также специфичный для BDNF тирозинкиназный TrkB рецептор [1, 5, 13]. Наибольшая экспрессия BDNF выявлена в таких структурах центральной нервной системы, как гиппокамп, мозжечок, кора, гипоталамус, перегородка. К настоящему времени открыто, что BDNF участвует в выживании и регуляции функционирования нейронов в том числе и во взрослом мозге. Он вовлечен в формирование синапсов и оказывает сильное влияние на рост, реконструкцию и стабильность дендритов и аксонов в гиппокампальных и кортикальных нейронах. Обнаружено, что BDNF способен повышать выживаемость нейронов, восстанавливать уже поврежденные, в том числе, ишемией/гипоксией и травмами [1, 13]. Выявлено вовлечение BDNF в ряд патологий. Так, у людей страдающих депрессией, шизофренией, болезнью Альцгеймера уровень мРНК BDNF и белка BDNF в ряде регионов мозга, а также сыворотке и плазме крови, снижен. Кроме того, есть данные, что возрастные изменения, происходящие в мозге, сопровождаются снижением содержания BDNF [1, 3, 7, 8].

Изучаемый нами генетический полиморфизм ассоциирован со снижением концентрации BDNF как в мозге, так и в плазме крови. В работе В.М. Шкловского и соавт. (2012) сделано предположение, что аллель Val полиморфизма Val66Met BDNF является фактором выживаемости больных при ишемическом и геморрагическом инсультах и тяжелой черепно-мозговой травме. В нашем исследовании частота генотипов и аллелей в группах наблюдения достоверно не отличалась и соответствовала общепопуляционным показателям, однако больные хронической ишемией мозга, осложненной когнитивной дисфункцией имели некоторое сравнительное снижение частоты BDNF-66Met. И, тем не менее, при изучении частот генотипов в клинических группах с увеличением тяжести заболевания наблюдалось снижение частоты гетерозигот и увеличение гомозигот ($p > 0,05$).

Таблица 1

Частота аллелей изучаемого полиморфизма у больных хронической ишемией мозга (2 группы) – резидентов Забайкальского края

Полиморфизм	Аллели	Частота аллели, р			χ^2 ; р (df=1)		OR (CI: 95 %)	
		Контрольная группа, (n=201)	1-я клинич. группа, (n=101)	2-я клинич. группа, (n=209)	для 1-й клинич. группы	для 2-й клинич. группы	для 1-й клинич. группы	для 2-й клинич. группы
CNTF G>A	G	0,88	0,83	0,82	2,76; 0,1	5,17; 0,02	0,67 (0,42-1,08)	0,63 (0,43-0,94)
	A	0,12	0,17	0,18			1,49 (0,94-2,4)	1,58 (1,06-2,35)
BDNF G>A Val-66Met	G	0,84	0,84	0,86	0,02; 0,88	0,28; 0,6	1,04 (0,65-1,66)	1,1 (0,75-1,64)
	A	0,16	0,16	0,14			0,97 (0,6-1,55)	0,9 (0,61-1,33)
VEGF-A A2578C	A	0,44	0,43	0,48	0,28; 0,6	0,97; 0,32	0,91 (0,65-1,29)	1,15 (0,87-1,52)
	C	0,56	0,57	0,52			1,1 (0,78-1,55)	0,87 (0,66-1,15)

Примечание. χ^2 , OR (CI: 95 %) – сравнение частоты аллелей в клинических группах и контрольной, сравнение между двумя клиническими группами не проводилось.

Таблица 2

Частота генотипов изучаемого полиморфизма у больных хронической ишемией мозга (2 группы) и резидентов Забайкальского края

Полиморфизм	Генотип	Частота генотипа, %			χ^2 ; р (df=1)		OR (CI: 95 %), df=2	
		Контрольная группа, (n=201)	1-я клинич. группа, (n=101)	2-я клинич. группа, (n=209)	для 1-й клинич. группы	для 2-й клинич. группы	для 1-й клинич. группы	для 2-й клинич. группы
CNTF G>A	GG	78,3	68	64,3	4,18; 0,12	14,42; 0,007	0,59 (0,34-1,0)	0,5 (0,32-0,78)
	GA	18,5	29	34,7			1,8 (1,02-3,17)	2,33 (1,46-3,73)
	AA	3,2	3	1			0,94 (0,23-3,85)	0,31 (0,06-1,53)
BDNF G>A Val66Met	GG	69,6	72	73,3	1,05; 0,59	1,34; 0,51	1,12 (0,66-1,91)	1,2 (0,77-1,85)
	GA	28,8	25	24,2			0,82 (0,48-1,43)	0,79 (0,51-1,24)
	AA	1,6	3	2,5			1,94 (0,38-3,78)	1,59 (0,37-6,75)
VEGF-A A2578C	AA	22,4	17,8	22,3	0,87; 0,65	2,74; 0,25	0,76 (0,41-1,4)	0,99 (0,62-1,6)
	AC	43,8	47,5	51			1,19 (0,73-1,93)	1,34 (0,9-1,99)
	CC	33,8	33,7	26,7			1,01 (0,6-1,68)	0,71 (0,46-1,1)

Примечание. χ^2 , OR (CI: 95 %) – сравнение частоты генотипов в клинических группах и контрольной, сравнение между двумя клиническими группами не проводилось.

CNTF-белок с МВ 22,8 кДа структурно подобен ингибирующему фактору лейкемии (LIF), интерлейкинам-6 и -11 и онкостатину М (OSM). CNTF идентифицирован как фактор, способствующий выживанию нейронов цилиарного ганглия эмбриона цыпленка. Большинство его эффектов связано с поддержанием клеток центральной и периферической нервной системы, включая нейроны гиппокампа и срединной перегородки, симпатические ганглии, мотонейроны, сен-

сорные нейроны. CNTF предотвращает дегенерацию моторных аксонов после их перерезки и способствует дифференцировке астроцитов и созреванию олигодендроцитов. Добавление CNTF к культуре глиальных клеток ведет к увеличению размера астроцитов обоего типа [1, 10].

Изучаемый нами полиморфизм CNTF (G>A) способствует изменению биологических свойств цитокина, что отражается на его функциях. Исследование настоящей мутации практически не освещено в научной литературе, однако, по данным нашего исследования отмечается явное увеличение носительства CNTF-A аллеля у пациентов дисциркуляторной энцефалопатией, причем, чем тяжелее заболевание, тем большая сравнительная частота минорного аллеля нами наблюдалась (р=0,02, табл. 1). В носительстве генотипов среди больных хронической ишемией мозга относительно контроля преобладают гетерозиготы, причем выявленный CNTF-GA-генотип повышает риск развития заболевания в 2,3 раза (р=0,007) (табл. 2). Можно предположить, что снижение трофического действия фактора у обладателей данного полиморфизма блокирует полноценную внутриклеточную регенетацию нейронов и клеточную регенерацию клеток, преимущественно астроцитарной глии, что приводит к преждевременной дегенерации нервной ткани и, соответственно, более ранним клиническим проявлениям заболевания.

VEGF-A, первый из идентифицированных представителей, обладает активностью ростового фактора клеток сосудистого эндотелия с плеотропными функциями: усиление миграции, пролиферация, образование трубчатых структур клетки. Благодаря уникальным функциям VEGF-A реализует корреляцию процессов проницаемости, воспаления, ангиогенеза [1, 4]. Экспрессия мРНК VEGF-A отмечена в сосудистых регионах, подверженных капилляризации, она VEGF-A индуцируется в макрофагах, Т-клетках, астроцитах, гладкомышечных клетках, кардиомиоцитах, эндотелии, кератиноцитах. Блокада VEGF специфическими антителами в острой фазе ишемического инсульта уменьшает проницаемость гематоэнцефалического барьера и увеличивает риск геморрагической трансформации [1, 9, 11, 12]. Изучаемый полиморфизм VEGF-A (A2578C) ассоциирован со снижением активности VEGF-A. По данным нашего исследования отмечается неожиданное увеличение частоты мутантного аллеля у резидентов контрольной группы и незначительное снижение его у представителей клинических групп, причем более выраженное у пациентов с более тяжелым нарушением мозговых функций (р>0,05), однако, у них относительно контрольной группы, отмечается увеличение количества гетерозигот. Вероятно, в данном случае имеется эффект сверхдоминирования с более агрессивным проявлением полиморфизма в фенотипе в гетерозиготном состоянии.

Безусловно, наличие и концентрация нейротрофических и ростовых факторов влияют на функционирование клеток нервной системы не только в норме, но и при различных патологических процессах, в частности ишемическом повреждении головного мозга. Генетический полиморфизм меняет функционирование

цитокинов, и соответственно отражается на работе химических нейрорегуляторов. Выявленное увеличение частоты CNTF-A аллеля у больных хронической ишемией мозга, вероятно, послужит сигналом для

более детального изучения настоящего фактора и использование полученных данных в практической ангионеврологии.

Литература

1. Гомазков О.Ф. Нейротрофические факторы мозга // Справочно-информационное издание. Электронная версия. – М., 2004. – 311 с.
2. Гусев Е.И., Сковцова В.И. Ишемия головного мозга. – М. Медицина, 2001. – 327 с.
3. Колесниченко Е.В., Барыльник Ю.Б., Голимбет В.Е. Редкий вариант поздней дискинезии у больных шизофренией с генотипом **MetMet** для полиморфизма Val66Met гена BDNF // Медицинские науки. – 2011. – № 9. – С. 257-259.
4. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 827 с.
5. Морозова М.В. Влияние нейротрофического фактора мозга (BDNF) на эпигенетически и генетически детерминированные нарушения поведения: автореферат дис. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2012. – 19 с.
6. Фариева Л.М. Фолдинг рекомбинантных нейротрофических факторов человека: автореферат дис. канд. хим. наук. – Москва, 2009. – 26 с.
7. Chen Z.Y., Patel P.D., Sant G., et. al. Variant brain-derived neurotrophic factor BDNF Met66 alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neu-

rons // J. Neurosci. – 2004. – Vol. 24, № 18. – P. 4401-4411.

8. Egan M., Kojima M., Callicott J., et. al. The BDNF val66met polymorphism affects activity dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // Cell. – 2003. – Vol. 112. – P. 25-26.

9. Fabel K., Fabel K., Tam B., et. al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // Eur. J. Neurosci. – 2003. – № 18 (10). – P. 2803-12.

10. Fantuzzi G., Benigni F., Sironi M., et. al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces serum amyloid A, hypoglycaemia and anorexia and potentiates IL-1 induced corticosterone and IL-6 production in mice // Cytokine. – 1995. – № 7 (2). – P. 150-156.

11. Hai J., Li S.T., Lin Q., Pan Q.G., et. al. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain // Neurosurgery. – 2003. – № 53 (4). – P. 963-970.

12. Josko J., Knefel K. The role of vascular endothelial growth factor in cerebral oedema formation // Folia Neuropathol. – 2003. – № 41 (3). – P. 161-166.

13. Liu X. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion // Neurosci. Lett. – 2001. – 308 (2). – P. 91-94.

Literature

1. Gomazkov O.F. Neurotrophic factors of the brain // Reference-informatoinal Edition. – М., 2004. – P. 311.
2. Gusev E.I., Skvortsova V.I. Ischemia of brain. – М.: Medizina, 2001. – P. 327.
3. Kolesnichenko E.V., Baryl'nik Y.U., Golimbet V.E. Rare variant of tardive dyskinesia in schizophrenic patients with genotip MetMet of the VAL66MET polymorphism of the BDNF gene // The medical sciences. – 2011. – № 9. – P. 257-259.
4. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms for regulation of hemostasis in norm and pathology. – Chita. : Express Publishing, 2010. – 827 p.
5. Morozova M.V. Effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on epigenetic and genetically determined disorders of behaviour: abstract of thesis ... candidate of biology science. Novosibirsk, 2012. – P. 19.
6. Farieva L.M. Folding recombinant human factors are neurotrophic : abstract of thesis ... candidate of himich science. – М., 2009. – P. 26.
7. Chen Z.Y., Patel P.D., Sant G., et. al. Variant brain-derived neurotrophic factor BDNF Met66 alters the intracellular trafficking and activity-dependent secretion of wild-type BDNF in neurosecretory cells and cortical neurons // J. Neurosci. – 2004. – Vol. 24, № 18. – P. 4401-4411.

8. Egan M., Kojima M., Callicott J., et. al. The BDNF val66met polymorphism affects activity dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function // Cell. – 2003. – Vol. 112. – P. 25-26.

9. Fabel K., Fabel K., Tam B., Kaufer D., et. al. VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis // Eur. J. Neurosci. – 2003. – Nov., № 18 (10). – P. 2803-12.

10. Fantuzzi G., Benigni F., Sironi M., et. al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) induces serum amyloid A, hypoglycaemia and anorexia and potentiates IL-1 induced corticosterone and IL-6 production in mice // Cytokine. – 1995. – № 7 (2). – P. 150-156.

11. Hai J., Li S.T., Lin Q., Pan Q.G., et. al. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain // Neurosurgery. – 2003. – № 53 (4). – P. 963-970.

12. Josko J., Knefel K. The role of vascular endothelial growth factor in cerebral oedema formation // Folia Neuropathol. – 2003. – № 41 (3). – P. 161-166.

13. Liu X. Non-invasive intranasal insulin-like growth factor-I reduces infarct volume and improves neurologic function in rats following middle cerebral artery occlusion // Neurosci Lett. – 2001. – № 308 (2). – P. 91-94.

Координаты для связи с авторами: Страмбовская Наталья Николаевна – канд. мед. наук, доцент, заведующая лабораторией молекулярной генетики НИИ молекулярной медицины ЧГМА, доцент кафедры нервных болезней, нейрохирургии и медицинской генетики ЧГМА, тел. +7-924-477-00-95, e-mail: strambovskaia@yandex.ru.