

Аллель Cys (полиморфизм Ser311Cys) гена рецептора дофамина D2 связан с шизофренией и нарушением избирательного внимания у больных

Д.б.н., зав. лаб. В.Е. ГОЛИМБЕТ¹, д.б.н., в.н.с. И.С. ЛЕБЕДЕВА¹, к.б.н. М.В. МОНАХОВ², к.б.н., в.н.с. Г.И. КОРОВАЙЦЕВА¹, к.б.н., н.с. Т.В. ЛЕЖЕЙКО¹, д.м.н., в.н.с. Л.И. АБРАМОВА¹, к.м.н. В.Г. КАЛЕДА¹, д.б.н. В.А. КАРПОВ²

The Cys allele of the DRD2 (Ser311Cys polymorphism) is associated with schizophrenia and worse sustained attention in patients

V.E. GOLIMBET, I.S. LEBEDEVA, M.V. MONAKHOV, G.I. KOROVAITSEVA, T.V. LEZHEIKO, L.I. ABRAMOVA, V.G. KALEDA, V.L. KARPOV

¹Научный центр психического здоровья РАМН; ²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва

В статье изучен полиморфизм Ser311Cys гена дофаминового рецептора D2 у 366 больных шизофренией и 387 человек контрольной группы. Обнаружено, что частота аллеля Cys была значимо выше ($p < 0,009$) в группе больных, чем в контроле (8,5 и 3,9% соответственно). Также проведено исследование избирательного внимания, оцениваемое по параметрам волны P300 слуховых вызванных потенциалов, у 66 больных с разными генотипами — SerSer и SerCys (генотипа CysCys в выборке больных не было). Было обнаружено значимое влияние генотипа ($p = 0,01$) на латентный период (ЛП) волны P300 в лобных, центральных и височных отведениях. У носителей аллеля Cys, связанного с риском развития шизофрении, величина ЛП была выше по сравнению с другими генотипами, что свидетельствует о замедлении у них психических процессов, связанных с активизацией ресурсов внимания. Таким образом, в работе подтверждены данные, полученные ранее для других популяций, о связи аллеля Cys с шизофренией, а также обнаружена ассоциация этого аллеля с ухудшением избирательного внимания у больных.

Ключевые слова: шизофрения, дофаминовые рецепторы D2, слуховые вызванные потенциалы, волна P300.

The DRD2 Ser311Cys polymorphism was studied in a sample which included 366 patients with schizophrenia and 387 healthy controls. The frequency of the Cys allele was significantly higher ($p < 0,009$) in the group of patients compared to the controls (8,5% and 3,9%, respectively). Sustained attention assessed by P300 parameters was studied in 66 patients with the SerSer and SerCys genotypes (the CysCys genotype was not observed in the sample studied). A significant effect ($p = 0,01$) of the SerCys genotype on P300 latency in frontal, central and temporal regions was found. Patients with the at-risk allele presented delayed latencies that reflected the lower speed of mental processes related to activation of attention resources. In conclusion, our data support the evidence of association between the Cys allele and schizophrenia obtained earlier for other populations and revealed that carriers of the genotype containing the at-risk allele had delayed P300 latencies.

Key words: schizophrenia, dopamine D2 receptors, auditory evoked potentials, P300 wave.

Согласно современным представлениям, дофаминовые рецепторы D2 играют ключевую роль в патогенезе шизофрении [11]. Поэтому неудивительно, что соответствующий ген является предметом многочисленных молекулярно-генетических исследований в психиатрии.

Ген дофаминового рецептора D2 расположен на длинном плече хромосомы 11. В нем описано несколько вариабельных участков (полиморфизмы), в том числе те, которые, по данным ряда исследований, ассоциированы с шизофренией. Одним из наиболее изученных полиморфизмов является Ser311Cys, расположенный в экзоне 7. Этот полиморфизм обусловлен однонуклеотидной заменой в положении 311 последовательности ДНК гена и представлен двумя вариантами (аллелями): в первом слу-

чае это аллель, содержащий нуклеотид цитозин (С), во втором — гуанин (G). Поскольку следствием замены нуклеотидов является изменение аминокислот в кодируемом белке (серин замещается на цистеин), в литературе эти аллели чаще обозначают как Ser и Cys. Аллель Cys является минорным, его частота в различных популяциях составляет менее 10%.

Изучение полиморфизма Ser311Cys началось в 1994 г. и по сути ознаменовало начало исследований шизофрении с использованием анализа ассоциаций. Предполагалось, что различные аллели, определяя разную структуру, и, как следствие, функцию рецептора, будут определять различную связь с заболеванием. В первой работе (Т. Arinami и соавт. [3]) было обнаружено, что наличие аллеля Cys

в 3 раза увеличивает риск развития шизофрении. Этот аллель был также связан с ранним проявлением болезни, наличием наследственной отягощенности и преобладанием позитивных симптомов в клинической картине заболевания. При этом биохимические исследования показали, что функции рецептора зависят от аллельного варианта [9]. Вслед за первыми публикациями последовало по меньшей мере двадцать других, и результаты соответствующих исследований оказались противоречивыми. Однако связь полиморфизма Ser311Cys с шизофренией была подтверждена в нескольких мета-анализах¹ [6, 7, 10]. Наиболее обстоятельным был мета-анализ, проведенный S. Glatt и соавт. [7] на материале 27 выборок, которые включали 3707 больных шизофренией и 5363 контрольных наблюдений. Этот анализ подтвердил, что с риском развития шизофрении связан аллель Cys. При этом повышенный риск был отмечен для гетерозигот SerCys по сравнению с гомозиготами SerSer, а гомозиготы CysCys вообще не были подвержены риску заболевания.

Цель настоящего исследования состояла в дальнейшем изучении связи полиморфизма Ser311Cys гена дофаминового рецептора D2 с шизофренией. Исследование предусматривало сравнение частоты аллеля Cys в группе больных по сравнению с контролем в русской популяции, поскольку ранее генотипирование по полиморфизму Ser311Cys в этой популяции не проводилось.

Кроме того, изучалась связь между этим полиморфизмом и одним из эндофенотипов² шизофрении. В психиатрической генетике считается, что такой подход может оказаться более информативным, чем анализ ассоциаций с заболеванием в целом, так как позволяет дифференцировать молекулярно-генетические механизмы отдельных базовых процессов болезни. В данном фрагменте работы анализировали аномалии избирательного внимания, оцениваемые по параметрам волны P300 слуховых вызванных потенциалов (ВП), зарегистрированных в парадигме oddball. Известно, что у больных шизофренией по сравнению с психически здоровыми людьми выше значения латентного периода (ЛП) и меньше амплитуда этой волны, причем величина этих изменений во многом определяется генетическими особенностями [2, 5]. В ряде исследований уже определяли связь данных нейрофизиологических показателей с полиморфизмом некоторых генов, однако анализ ассоциации с полиморфизмом Ser311Cys гена дофаминового рецептора D2 проводился впервые в мире.

Материал и методы

В исследование были включены находившиеся на лечении в клинике Научного центра психического здоровья РАМН 366 больных шизофренией (рубрика F20 по МКБ-10), 198 (54,1%) мужчин и 168 (45,9%) женщин. Средний возраст обследованных был $35,0 \pm 12,4$ года, возраст пациентов к началу заболевания — $25,2 \pm 8,6$ года. Все

¹Мета-анализ — анализ, выполненный с использованием специальных статистических подходов, который позволяет оценить ассоциацию полиморфизма с заболеванием с учетом результатов, полученных в разных исследованиях.

²Эндофенотип, или промежуточный фенотип, это признак, который связан с заболеванием и проявляется не только у больных, но и у их близких родственников.

больные на момент обследования принимали различные психотропные препараты.

Контрольная группа состояла из 387 психически здоровых, 147 (38%) мужчин и 240 (62%) женщин; их средний возраст был $31,5 \pm 12,5$ года.

Все участники исследования считали себя этнически русскими. Исследование проводили при получении от обследованных информированного согласия.

Электрофизиологическое исследование было проведено у 66 больных, 40 (60,6%) мужчин, 26 (39,4%) женщин; средний возраст этой группы пациентов был $26,7 \pm 7,7$ года, их возраст к началу заболевания — $22,8 \pm 5,8$ года.

Регистрацию слуховых ВП проводили в стандартной парадигме oddball с вероятностью предъявления целевого стимула (тон, частота 2 кГц, интенсивность 60 дБ) — 0,2 и нецелевого (тон, частота 1 кГц, интенсивность 60 дБ) — 0,8. Испытуемые должны были реагировать только на целевые стимулы нажатием кнопки. Стимулы подавались бинаурально, с частотой один раз в 2 с, межстимульный интервал варьировал в диапазоне 20%. ВП регистрировали на системе картирования Brain Atlas («Bio-logic», США) с on-line удалением артефактов (всего в итоговый анализ входило 30 целевых стимулов), эпоха анализа составляла 512 мс, включая 60 мс престаимульный интервал. Компонент P300 выделялся как наибольшая позитивная волна в интервале 280—450 мс. Его пиковые латентности и амплитуды определяли в отведениях F3, F4, F7, F8, T3, T4, C3, C_Z, C4, P3, P_Z и P4.

Молекулярно-генетическое исследование предусматривало взятие венозной крови больных, выделение ДНК и генотипирование с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генотипы испытуемых определяли с помощью метода RT-PCR с аллель-специфическими TaqMan-зондами (ЗАО «Синтол», Москва), несущими красители FAM и R6G, а также BHQ1 в качестве гасителя. Набор реактивов для ПЦР был получен от фирмы «Синтол». Праймеры и зонды были подобраны с помощью программы PrimerExpress. Для одной реакции брали 10 нг геномной ДНК, по 0,3 пмоль/мкл праймеров и по 0,2 пмоль/мкл зондов, амплификацию проводили в течение 40 циклов на приборе ABI PRISM 7000 Sequence Detection System. Флюоресценцию каждого красителя измеряли до и после полимеразной цепной реакции, используя для дальнейших расчетов разницу значений. Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения ABI PRISM 7000 Sequence Detection System.

Статистические методы. Различия в частоте генотипов в группах больных и контроля проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. Риск шизофрении при наличии соответствующего аллельного варианта рассматривали с помощью показателя отношение шансов (ОШ) с приведением доверительного интервала при вероятности 95% (95% ДИ). При статистической обработке данных электрофизиологического исследования использовали обобщенную линейную модель многомерного ковариационного анализа. На первом этапе в качестве зависимой переменной рассматривали композитный индекс, включающий латентности или амплитуды волны P300 ВП во всех отведениях, а независимым фактором являлся генотип. При обнаружении значимого эффекта генотипа проводили серию анализов с использованием композитного индекса, включающего латентности или амплитуды волны ВП раздельно в лобных (F), центральных (C), височных

Таблица 1. Частота генотипов Ser311Cys гена дофаминового рецептора D2 в группе больных шизофренией и контроле

| Генотип | Больные шизофренией | | Контроль | | |
|----------------|---------------------|-----|----------|-----|------|
| | n | % | n | % | |
| Гомозиготы 1 | SerSer | 335 | 91,5 | 372 | 96,1 |
| Гетерозиготы | SerCys | 31 | 8,5 | 15 | 3,9 |
| Гомозиготы 2 | CysCys | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Всего образцов | | 366 | 100 | 387 | 100 |

Примечание. Различия в распределении генотипов между двумя группами значимы — $\chi^2=6,9$; $df=1$; $p=0,009$; ОШ 2,3 ДИ 95% (1,2—4,3).

Таблица 2. Величины латентного периода (мс) у носителей различных генотипов рецептора D2 (полиморфизм Ser311Cys)

| Отведение | Генотип SerSer | Генотип SerCys | Вероятность (p) |
|-----------|----------------|----------------|-----------------|
| F3 | 381,6 (36,1) | 410 (13,8) | 0,024 |
| F4 | 382,4 (34,5) | 420,5 (28,3) | 0,021 |
| T3 | 378,8 (33,8) | 410 (17,7) | 0,034 |
| T4 | 369,4 (41,8) | 423,5 (19,3) | 0,037 |
| C3 | 370,9 (32) | 410,5 (16,4) | 0,018 |
| Cz | 368,7 (33,0) | 382 (42,1) | 0,09 |

(Т) и теменных (Р) отведениях. При наличии ассоциации проводили апостериорный анализ для определения связи между генотипом и параметрами волны. На всех этапах в модель вводили в качестве ковариат возраст и показатель выраженности клинических симптомов, которые оценивали количественно с помощью шкалы позитивных и негативных симптомов (PANSS).

Результаты и обсуждение

Частота генотипов по маркеру Ser311Cys приведена в табл. 1. Гомозиготы по аллелю Cys не были обнаружены ни в группе больных, ни в контроле. При сравнении данных по частоте гетерозиготного генотипа SerCys, или в данном случае аллеля Cys, полученной для контрольной группы, с другими популяциями (данные по частоте аллелей приведены в работе [6]) оказалось, что у русских эта величина попадает в интервал приведенных различий (0,8—3,9%). Сравнение распределения генотипов в группах больных и контроля показало существование ассоциации между полиморфизмом Ser311Cys и шизофренией ($p<0,009$). Частота аллеля Cys в группе больных была значимо ($p<0,009$) выше, чем в контроле (8,5 и 3,9% соответственно).

В группе больных шизофренией, обследованных электрофизиологически, распределение генотипов было следующим: генотип SerSer — 52 человека, генотип SerCys — 5, генотип CysCys не был обнаружен. Анализ параметров волны P300 слуховых вызванных потенциалов показал, что генотип не оказывал значимого эффекта на амплитуду волны P300 ($p=0,6$). В то же время значимый эффект генотипа ($F=2,7$; $df=12$, $p=0,01$) был обнаружен для ЛП, причем зависел от локализации отведений. Он отмечался в случае лобных ($F=2,8$; $df=4$, $p=0,03$), центральных ($F=4,4$; $df=3$, $p=0,008$) и височных ($F=3,18$; $df=2$, $p=0,050$) отведений и отсутствовал для теменных ($p=0,56$). Апостериорный анализ для каждого отведения выявил различия в величинах ЛП у носителей различных генотипов рецептора D2 в следующих отведениях: F3, F4, T3, T4 и C3. Для отведения Cz различия были обнаружены на уровне тенденции. Данные приведены в табл. 2. Как следует из представленных данных, у носителей аллеля Cys величина ЛП

была выше, чем у больных, в генотипе которых этот аллель отсутствовал³.

Ранее проведенные исследования показали [1], что у больных шизофренией латентный период волны P300 ВП был больше, чем у психически здоровых. Это связывают с замедлением психических процессов при шизофрении и в том числе с тем, что больным необходимо большее время для активизации ресурсов внимания [8]. В нашем исследовании максимальное замедление было отмечено именно у тех больных, которые являлись носителями аллеля Cys, наиболее часто встречающегося у больных шизофренией. Следует отметить, что о связи гена дофаминового рецептора D2 с длительностью ЛП P300 упоминалось и ранее [4, 12]. Было обнаружено, что полиморфизм Taq1A ассоциирован с латентным периодом у больных с психическими расстройствами, а также у детей, один из родителей которых страдает алкоголизмом. Данные, полученные в нашей работе, также подтверждают связь гена дофаминового рецептора D2 в первую очередь с временными характеристиками биоэлектрической активности мозга, отражающими процессы избирательного внимания.

Следует сказать, что, хотя объемы используемых нами выборок сходны с анализируемыми в ряде других работ, результаты исследования нейрофизиологических показателей стоит рассматривать как предварительные, требующие подтверждения на большей группе испытуемых. Тем не менее на основании полученных в нашем исследовании данных может быть сделан вывод о связи аллеля Cys с шизофренией для русской популяции. В этом исследовании было также впервые обнаружено, что этот аллель в группе больных шизофренией ассоциируется с большей величиной ЛП волны P300 слуховых ВП.

Работа выполнена при поддержке грантом №08-06-00084а Российского гуманитарного научного фонда.

³Сравнение данных у больных с нормативными данными, полученными с применением тех же методических подходов [2], показало, что ЛП у больных из групп с обоими генотипами выше, чем в норме.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алфимова М.В., Уварова Л.Г., Трубников В.И. Метод вызванных потенциалов в исследовании познавательных процессов при шизофрении. Журн неврол и психиатр 1999; 99: 1: 62—68.
2. Лебедева И.С., Каледа В.Г., Абрамова Л.И. и др. Нейрофизиологические аномалии в парадигме P300 как возможные эндофенотипы шизофрении. Журн неврол и психиатр 2008; 108: 1: 61—70.
3. Arinami T., Itokawa M., Enguchi H. et al. Association of dopamine D2 receptor molecular variant with schizophrenia. Lancet 1994; 343: 8899: 703—704.
4. Blum K., Braverman E.R., Dinardo M.J. et al. Prolonged P300 latency in a neuropsychiatric population with the D2 dopamine receptor A1 allele. Pharmacogenetics 1994; 4: 6: 313—322.
5. Bramon E., McDonald C., Croft R.J. et al. Is the P300 wave an endophenotype for schizophrenia? A meta-analysis and a family study. Neuroimage 2005; 27: 4: 960—968.
6. Glatt S.J., Faraone S.V., Tsuang M.T. Meta-analysis identifies an association between the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. Mol Psychiatr 2003; 8: 911—915.
7. Glatt S.J., Jonsson E.G. The Cys allele of the DRD2 Ser311Cys polymorphism has a dominant effect on risk for schizophrenia: evidence from fixed- and random-effects meta-analyses. Am J Med Genet B Neuropsychiat Genet 2006; 141: 2: 149—154.
8. Houlihan M., Stelmack R., Campbell K. P300 and cognitive ability: Assessing the roles of processing speed, perceptual processing demands and task difficulty. Intelligence 1998; 26: 9—25.
9. Itokawa M., Arinami T., Futamura N. et al. A structural polymorphism of human dopamine D2 receptor, D2(Ser311>Cys). Biochemical and Biophysical Res Communications 1993; 196: 3: 1369—1375.
10. Jonsson E.G., Sillen A., Vares M. et al. Dopamine D2 receptor gene Ser-311Cys variant and schizophrenia: association study and meta-analysis. Am J Med Genet 2003; 119B: 28—34.
11. Meisenzahl E.M., Schmitt G.J., Scheuerecker J., Möller H.-J. The role of dopamine for the pathophysiology of schizophrenia. Int Rev Psychiatr 2007; 19: 4: 337—345.
12. Noble E.P., Berman S.M., Ozkaragoz T.Z. et al. Prolonged P300 latency in children with the D2 dopamine receptor A1 allele. Am J Hum Genet 1994; 54: 4: 658—668.