

УДК 616.831-005-036.12:575

А.М. Кардаш, В.П. Кардаш, М.С. Кишеня, А.И. Кисс, Д.М. Куприч, С.А. Паршиков

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» МЗ РФ, Донецк

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА G-634C ГЕНА VEGFA НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СУБДУРАЛЬНОЙ ГЕМАТОМОЙ

Хроническая субдуральная гематома (ХСГ) представляет объемное кровоизлияние, располагающееся между твердой и паутинной мозговыми оболочками. Наиболее частой причиной образования ХСГ служит черепно-мозговая травма (ЧМТ) легкой и средней степени тяжести [1]. ХСГ в структуре ЧМТ составляет 1,5–8% с распространенностью 1-5,3 случая на 100 000 населения в зависимости от возрастной категории с тенденцией увеличения у лиц пожилого старческого возраста до 58-123 случаев на 100 000 населения [2]. С каждым годом заболеваемость ХСГ увеличивается из-за старения населения и связанных с ним заболеваний, таких как артериальная гипертензия, атеросклероз, сахарный диабет, требующих систематического назначения антикоагулянтной терапии [3]. Пусковым механизмом в развитии ХСГ может явиться ЧМТ легкой степени, в результате которой слой пограничных клеток твердой мозговой оболочки повреждается, приводя к экстравазации спинномозговой жидкости и крови в субдуральное пространство. На этом фоне запускается каскад ключевых патологических реакций, таких как воспаление и ангиогенез, нарушение коагуляции и фибринолиз при развитии ХСГ [4]. В результате пролиферации пограничных клеток и фибробластов твердой мозговой оболочки происходит формирование капсулы, состоящей из субдуральных неомембран (наружной и внутренней), ограничивающих гематому. В просвете капсулы гематомы происходят изменения клеточной и сосудистой организации с образованием многочисленных тонкостенных капилляров большого диаметра [5]. Образованные микрососуды являются функционально неполноценными, обладают повышенной хрупкостью и проницаемостью, что обуславливает прогрессирование ХСГ за счет увеличения объема [6].

Процесс ангиогенеза обусловлен сосудистыми факторами роста, основным из которых является фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Синтез последнего регулируется одноименным

геном [7], экспрессию которого вызывает индуцируемый гипоксией фактор-1 α (HIF-1 α). Ген VEGF локализован на коротком плече 6-й хромосомы (6p21.3) и состоит из 8 экзонов, разделенных 7 интронами. В семейство гена VEGF входят пять основных представителей, из которых для роста кровеносных сосудов наиболее значим VEGFA, влияющий на ангиогенез через клетки эндотелия сосудов и активацию других факторов роста [8]. Наличие полиморфных участков в регуляторных регионах гена VEGFA способно влиять на уровень экспрессии мРНК и, тем самым, изменять интенсивность синтеза VEGF. При изучении однонуклеотидного полиморфизма G-634C гена VEGFA была установлена ассоциация аллели С с высоким уровнем экспрессии VEGF [9]. Обнаружено, также, что генотип СС связан с более высокой концентрацией VEGF в крови по сравнению с генотипами СG и GG [10].

Исходя из предположения о возможном наличии у пациентов с ХСГ различных комбинаций генотипов гена VEGFA можно ожидать существенных влияний на уровень продукции VEGF в зависимости от аллельной структуры, которая в значительной мере может влиять на активность ангиогенеза, и клинико-неврологические проявления ХСГ. Так как клинико-неврологические характеристики ХСГ отражают, достаточно поздние и, зачастую, уже необратимые вторичные гипоксические повреждения головного мозга, следует считать актуальным развитие диагностических направлений, основанных на поиске молекулярно-генетических факторов, ассоциированных с патогенетическими механизмами развития ХСГ. Изучение роли полиморфизма G-634C гена VEGFA в развитии ХСГ позволит оценить генетический риск развития ХСГ и установить влияние

полиморфных генотипов на показатели неврологического статуса.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследование связи полиморфизма G-634C гена VEGFA с развитием ХСГ и влияния полиморфных генотипов на показатели неврологического статуса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 246 пациентов с диагнозом ХСГ, находившихся на лечении в отделении нейрохирургии Донецкого клинического территориального медицинского объединения Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики. Среди больных было 197 (80,08%) мужчин и 49 (19,92%) женщин в возрасте от 19 до 75 лет, которым выполняли малоинвазивные операции с наложением 2-х фрезевых отверстий и дренирование полости гематомы. Все пациенты были разделены на 2 группы: I группа – 184 человека с безрецидивным и II группа - 62 человека с рецидивирующим течением в послеоперационном периоде. В обеих группах обследование пациентов проводили при первичном обращении до операции (период А). Повторное обследование (период Б) в I группе выполняли через 4 месяца после операции, а во II группе – при обращении с рецидивами ХСГ, образовавшимися до 4-х месяцев после удаления гематомы. Контрольная группа включала 65 человек, отобранных по возрасту и половой принадлежности, перенесших легкую ЧМТ без развития ХСГ, сопоставимых с основной группой ($p > 0,05$). Пациентам с ХСГ проводили общеклиническое обследование, неврологический осмотр, компьютерную томографию головного мозга. Оценку степени неврологического дефицита осуществляли с использованием шкалы

Маркуолдера (Markwalder grading score – MGS). Отсутствие неврологического дефицита оценивали в 0 баллов; отсутствие или легкий неврологический дефицит с рефлекторной асимметрией, легкой головной болью с сохраненным вниманием и ориентацией – в 1 балл; неврологический дефицит с пространственной дезориентацией, синдром оглушения сознания, гемипарез – в 2 балла; неврологический дефицит со ступорозным состоянием, но с адекватной реакцией на раздражители, гемиплегию – в 3 балла; коматозное состояние с отсутствием реакции на внешние раздражители, децеребрацию/декортикацию – в 4 балла [11].

Анализ полиморфизма G-634C гена VEGFA изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с дальнейшей электрофоретической разгонкой продуктов амплификации в 3% агарозном геле и окрашивания 1% раствором бромистого этидия в проходящем ультрафиолетовом свете при длине волны 312 нм в трансиллюминаторе «TFX-20M» («Vilber Lourmat», Франция). Выделение геномной ДНК из лейкоцитов цельной венозной крови проводили с использованием комплекта реактивов «ДНК-экспресс-кровь» НПФ «Литех» (РФ). ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик». С каждым образцом выделенной ДНК проводили амплификацию с двумя аллель-специфическими праймерами, соответственно контекста SNP (G-634C). В качестве набора реагентов для амплификации применяли «SNP-экспресс, VEGFA(-C634G)», НПФ «Литех» (РФ).

Частоты распределения генотипов в исследуемых выборках проверяли на отклонение от равновесия Харди-Вайнберга с помощью критерия χ^2 Пирсона [1]. Достоверность различий в распределении частот генотипов и аллелей при сравнении групп «случай-контроль» оценивали

Таблица 1.

Распределения частот генотипов и аллелей rs2010963 гена VEGFA, их влияние на развитие ХСГ и степень ассоциации с заболеванием

Генотипы/аллели	Группы		χ^2	p	ОШ	95% ДИ
	I+II	Контроль				
GG	79 (0,321)	31 (0,477)			0,519	0,298 - 0,904
GC	124 (0,504)	27 (0,415)	5,80	0,055	1,430	0,823 - 2,487
CC	43 (0,175)	7 (0,108)			1,755	0,750 - 4,108
G	282 (0,573)	89 (0,685)			0,619	0,410 - 0,933
C	210 (0,427)	41 (0,315)	5,30	0,021	1,617	1,072 - 2,438

Примечание: χ^2 – критерий Пирсона; p – статистическая значимость различий между группами; ОШ – отношение шансов; 95% ДИ – 95% доверительный интервал для ОШ.

с помощью анализа таблиц сопряженности по критерию χ^2 . Степень ассоциации генотипов и аллелей с заболеванием определяли по величине отношения шансов (ОШ). Величина ОШ больше 1 указывала на повышение, а ниже 1 – на снижение риска, при условии попадания в 95% доверительный интервал (95% ДИ). Все различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Для отображения данных неврологического состояния использовали медиану (Me) и межквартильный интервал (Q1-Q3). Сравнение результатов между I и II группами осуществляли с помощью критерия Манна-Уитни, между периодами А и Б – с использованием критерия Вилкоксона. Различия в распределении частот категориальных признаков рассчитывали по критерию χ^2 Пирсона. Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA (v.10) (StatSoft Inc, USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизма G-634C гена VEGFA между пациентами с ХСГ и лицами контрольной группы (табл. 1.) показал отсутствие связи генотипов с заболеванием ($\chi^2=5,80$; $p=0,055$) и, в тоже время, выявил статистически значимую связь с частотами аллелей ($\chi^2=5,30$; $p=0,021$). Тест Харди-Вайнберга для группы контроля и группы пациентов с ХСГ соответствовал случайному характеру наследования генотипов (соответственно, $\chi^2=0,09$; $p=0,956$ и $\chi^2=0,22$; $p=0,896$).

Таким образом, минорная аллель С rs2010963 гена VEGFA увеличивала шансы развития ХСГ, являясь фактором риска развития данного заболевания, тогда как предковую аллель G можно считать протективным фактором.

Сравнительный анализ степени неврологических нарушений у пациентов с ХСГ, проведенный с применением шкалы MSG, показал суще-

ственные различия между группами до и после лечения.

В I группе до операции неврологические нарушения по шкале MSG оценивали в 2 (1-2) балла, после операции отмечена положительная динамика степени выраженности неврологических расстройств, на что указывало их значимое снижение до 0 (0-1) баллов ($p < 0,001$). Во II группе пациентов до операции неврологический статус был оценен в 2 (1-2) балла, а при рецидивировании ХСГ наблюдали значимое увеличение степени неврологического дефицита до 2 (2-2) баллов ($p < 0,001$). Рецидивы ХСГ клинически проявлялись неадекватной реакцией на внешние раздражители и пространственной дезориентацией на фоне оглушенного сознания, ступором, гемипарезами и гемиплегиями. Сравнение значений шкалы MSG между группами пациентов с отсутствием и развитием рецидивов ХСГ с помощью U-критерия Манна-Уитни показало отсутствие значимой разницы результатов в дооперационном периоде ($p=0,829$). Сравнение результатов оценивания по шкале MSG при повторном обращении в периоде Б показало значимые отличия ($p < 0,001$) между пациентами с отсутствием и развитием рецидивов ХСГ.

Далее было проанализировано наличие влияния полиморфизма G-634C гена VEGFA на степень неврологических нарушений по данным шкалы MSG у пациентов с ХСГ, как одного из ключевых патогенетических механизмов заболевания (табл. 2.).

Исследование взаимосвязи показателей неврологического статуса, оцененного по шкале MGS, с генотипами G-634C гена VEGFA позволило установить более высокую степень выраженности неврологических нарушений у носителей CC генотипа. Высокие значения MGS в I группе в А периоде такие как 2 (2-2) балла свидетельствовали о неврологических нарушениях при формировании ХСГ и были выявлены в группах пациентов с GC и CC генотипами, содержащими

Таблица 2.

Распределение клиничко-неврологических данных больных с ХСГ в зависимости от генотипов полиморфизма G-634C гена VEGFA

Показатель	Генотип	I группа		II группа	
		А	Б	А	Б
MGS, баллы	GG	2 (0-2)	0 (0-0)	1 (0-2)	2 (1-2)
	GC	2 (2-2)	0 (0-0)	2 (1-2)	2 (2-2)
	CC	2 (2-2)	0 (0-1)	2 (2-2)	2 (2-2)
		N=16,04; p<0,001	N=8,67; p=0,013	N=11,65; p=0,003	N=6,42; p=0,040

Примечание: p – статистическая значимость различий между группами; N – критерий Краскела-Уоллиса

минорную С аллель, что подтверждалось статистически достоверными значениями ($H=16,04$; $p<0,001$). Характерным для неврологического состояния больных I группы в периоде Б было значимое отсутствие нарушений 0 (0-0) баллов у носителей GG и GC генотипов с наличием признаков нейродефицита у лиц с CC генотипом 0 (0-1) баллов ($H=8,67$; $p=0,013$). Во II группе больных в периодах А и Б результаты оценивания неврологического состояния больных по генотипам rs2010963 гена VEGFA распределялись с достоверными различиями: $H=11,65$; $p=0,003$ и $H=6,42$; $p=0,049$, соответственно. Наибольшие

значения по шкале MGS 2 (2-2) балла были отмечены у носителей CC генотипа до операции в периоде А, а также CC и GC генотипов после операции в периоде Б при развитии рецидивов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наличие минорного генотипа CC полиморфизма rs2010963 гена VEGFA сопровождалось более выраженными неврологическими нарушениями у пациентов с ХСГ, что свидетельствовало о функциональной активности реакции васкулогенеза в патогенезе ХСГ и возникновении рецидивов.

А.М. Кардаш, В.П. Кардаш, М.С. Кишеня, А.И. Кисс, Д.М. Куприч, С.А. Паршиков

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет имени М. Горького» МЗ РФ, Донецк

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА G-634C ГЕНА VEGFA НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕВРОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СУБДУРАЛЬНОЙ ГЕМАТОМОЙ

Хронические субдуральные гематомы характеризуются частыми рецидивами, требующими повторной операции. Цель работы: изучить особенности неврологического статуса больных с хронической субдуральной гематомой на фоне оперативного лечения с рецидивным и безрецидивным течением. В исследование включены 246 пациентов от 19 до 75 лет, которым оперативным путем удаляли гематому с дренированием субдурального пространства. В I группе (184 человека) не выявляли рецидивы, во II группе (62 человека) в течение 4-х месяцев наблюдали развитие рецидивов гематомы. Пациентам с хронической субдуральной гематомой проводили общеклиническое обследование, неврологический осмотр, компьютерную томографию головного мозга, оценку степени неврологического дефицита с использованием шкалы Маркуолдера (Markwalder grading score – MGS). Анализ полиморфизма G-634C гена VEGFA изучали методом полимеразной цепной реакции. По шкале MSG

результаты оценивания до операции в I группе не отличались от II группы и составляли 2 (1-2) балла. При безрецидивном течении хронической субдуральной гематомы неврологическое состояние оценено 0 (0-1) баллами. Развитие рецидивов приводило к увеличению показателя до 2 (2-2) баллов ($p<0,001$). Установлено наличие ассоциации С-аллельного полиморфизма rs2010963 гена VEGFA с развитием хронической субдуральной гематомы (ОШ=1,62; 95% ДИ 1,07-2,44). Пациенты с хронической субдуральной гематомой с минорным генотипом CC rs2010963 гена VEGFA имели более выраженные неврологические нарушения, что свидетельствовало о функциональной активности реакции васкулогенеза в патогенезе хронической субдуральной гематомы и возникновении рецидивов.

Ключевые слова: хроническая субдуральная гематома, неврологический дефицит, шкала Markwalder, ген VEGFA, полиморфизм rs2010963.

А.М. Kardash, V.P. Kardash, M.S. Kishenya, A.I. Kiss, D.M. Kuprich, S.A. Parshikov

FSBEI HE «M. Gorky Donetsk State Medical University» MOH Russia, Donetsk

INFLUENCE OF G-634C POLYMORPHISM OF THE VEGFA GENE ON INDICATORS OF NEUROLOGICAL STATE IN PATIENTS WITH CHRONIC SUBDURAL HEMATOMA

Chronic subdural hematomas are characterized by frequent relapses requiring reoperation. Purpose of the work: to study the features of the neurological status of patients with chronic subdural hematoma during surgical treatment with recurrent and non-relapse course. The study included 246 patients aged 19 to 75 years, who had a hematoma surgically removed with drainage of the subdural space. In group I (184 patients) no relapses were detected, in group II (62 patients) the development of hematoma relapses was observed within 4 months. Patients with chronic subdural hematoma underwent a general clinical examination, neurological examination, comput-

ed tomography of the brain, and assessment of the degree of neurological deficit using the Markwalder grading score (MGS). Analysis of the G-634C polymorphism of the VEGFA gene was studied by polymerase chain reaction. According to the MSG scale, the results of assessment before surgery in group I did not differ from group II and amounted to 2 (1-2) points. In the case of a relapse-free course of chronic subdural hematoma, the neurological condition was rated 0 (0-1) points. The development of relapses led to an increase in the score to 2 (2-2) points ($p<0.001$). An association was established between the C-allelic polymorphism rs2010963 of the VEGFA gene

and the development of chronic subdural hematoma (OR=1.62; 95% CI 1.07-2.44). Patients with chronic subdural hematoma with the minor genotype CC rs2010963 of the VEGFA gene had more pronounced neurological disorders, which indicated the functional activity of the

vasculogenesis reaction in the pathogenesis of chronic subdural hematoma and the occurrence of relapses.

Key words: chronic subdural hematoma, neurological deficit, Markwalder scale, VEGFA gene, rs2010963 polymorphism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karibe H., Kameyama M., Kawase M., Hirano T., Kawaguchi T., Tominaga T. Epidemiology of chronic subdural hematomas. *No Shinkei Geka*. 2011; 39 (12): 1149-1153.
2. Krupa M. Chronic subdural hematoma: A review of the literature. Part 1. *Ann. Acad. Med. Stetin*. 2009; 55: 47-52.
3. Yadav Y.R., Parihar V., Namdev H., Bajaj J. Chronic subdural hematoma. *Asian J Neurosurg*. 2016; 11 (4): 330-342. doi: 10.4103/1793-5482.145102.
4. Holl D.C., Volovici V., Dirven C.M.F., Peul W.C., van Kooten F., Jellema K., van der Gaag N.A., Miah I.P., Kho K.H., den Hertog H.M., Lingsma H.F., Dammers R. Dutch Chronic Subdural Hematoma Research Group (DSHR). Pathophysiology and Nonsurgical Treatment of Chronic Subdural Hematoma: From Past to Present to Future. *World Neurosurg*. 2018; 116: 402-411.e2. doi: 10.1016/j.wneu.2018.05.037.
5. Hohenstein A., Erber R., Schilling L., Weigel R. Increased mRNA expression of VEGF within the hematoma and imbalance of angiopoietin-1 and -2 mRNA within the neomembranes of chronic subdural hematoma. *J Neurotrauma*. 2005; 22 (5): 518-528. doi: 10.1089/neu.2005.22.518.
6. Nanko N., Tanikawa M., Mase M. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF in the mechanism and development of chronic subdural haematoma. *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*. 2009; 49 (9): 379-385.
7. Hong H.J., Kim Y.J., Yi H.J., Ko Y., Oh S.J., Kim J.M. Role of angiogenic growth factors and inflammatory cytokine on recurrence of chronic subdural hematoma. *Surg Neurol*. 2009; 71 (2): 161-165. doi: 10.1016/j.surneu.2008.01.023.
8. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayer-Pietsch B., Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37 (6): 443-448. doi: 10.1159/000054076.
9. Shahbazi M., Fryer A.A., Pravica V., Brogan I.J., Ramsay H.M., Hutchinson I.V., Harden P.N. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13 (1): 260-264. doi: 10.1681/ASN.V131260.
10. Han S.W., Kim G.W., Seo J.S., Kim S.J., Sa K.H., Park J.Y., Lee J., Kim S.Y., Goronzy J.J., Weyand C.M., Kang Y.M. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004; 43 (9): 1173-1177. doi: 10.1093/rheumatology/keh281.
11. Markwalder T.M., Steinsiepe K.F., Rohner M., Reichenbach W., Markwalder H. The course of chronic subdural hematomas after burr-hole craniostomy and closed-system drainage. *J Neurosurg*. 1981; 55 (3): 390-396. doi: 10.3171/jns.1981.55.3.0390.

REFERENCES

1. Karibe H., Kameyama M., Kawase M., Hirano T., Kawaguchi T., Tominaga T. Epidemiology of chronic subdural hematomas. *No Shinkei Geka*. 2011; 39 (12): 1149-1153.
2. Krupa M. Chronic subdural hematoma: A review of the literature. Part 1. *Ann. Acad. Med. Stetin*. 2009; 55: 47-52.
3. Yadav Y.R., Parihar V., Namdev H., Bajaj J. Chronic subdural hematoma. *Asian J Neurosurg*. 2016; 11 (4): 330-342. doi: 10.4103/1793-5482.145102.
4. Holl D.C., Volovici V., Dirven C.M.F., Peul W.C., van Kooten F., Jellema K., van der Gaag N.A., Miah I.P., Kho K.H., den Hertog H.M., Lingsma H.F., Dammers R. Dutch Chronic Subdural Hematoma Research Group (DSHR). Pathophysiology and Nonsurgical Treatment of Chronic Subdural Hematoma: From Past to Present to Future. *World Neurosurg*. 2018; 116: 402-411.e2. doi: 10.1016/j.wneu.2018.05.037.
5. Hohenstein A., Erber R., Schilling L., Weigel R. Increased mRNA expression of VEGF within the hematoma and imbalance of angiopoietin-1 and -2 mRNA within the neomembranes of chronic subdural hematoma. *J Neurotrauma*. 2005; 22 (5): 518-528. doi: 10.1089/neu.2005.22.518.
6. Nanko N., Tanikawa M., Mase M. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF in the mechanism and development of chronic subdural haematoma. *Neurologia Medico-Chirurgica (Tokyo)*. 2009; 49 (9): 379-385.
7. Hong H.J., Kim Y.J., Yi H.J., Ko Y., Oh S.J., Kim J.M. Role of angiogenic growth factors and inflammatory cytokine on recurrence of chronic subdural hematoma. *Surg Neurol*. 2009; 71 (2): 161-165. doi: 10.1016/j.surneu.2008.01.023.
8. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayer-Pietsch B., Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res*. 2000; 37 (6): 443-448. doi: 10.1159/000054076.
9. Shahbazi M., Fryer A.A., Pravica V., Brogan I.J., Ramsay H.M., Hutchinson I.V., Harden P.N. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13 (1): 260-264. doi: 10.1681/ASN.V131260.
10. Han S.W., Kim G.W., Seo J.S., Kim S.J., Sa K.H., Park J.Y., Lee J., Kim S.Y., Goronzy J.J., Weyand C.M., Kang Y.M. VEGF gene polymorphisms and susceptibility to rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2004; 43 (9): 1173-1177. doi: 10.1093/rheumatology/keh281.
11. Markwalder T.M., Steinsiepe K.F., Rohner M., Reichenbach W., Markwalder H. The course of chronic subdural hematomas after burr-hole craniostomy and closed-system drainage. *J Neurosurg*. 1981; 55 (3): 390-396. doi: 10.3171/jns.1981.55.3.0390.