

УДК 575.174.015.3: 612.82: 616.8-009.85
DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma80926>
Научная статья



РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА RS6265 В ГЕНЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА МОЗГА ЧЕЛОВЕКА

Г.Г. Кутелев¹, А.Б. Криворучко¹, А.Е. Трандина¹, Н.Е. Морозова², Д.В. Черкашин¹,
А.М. Иванов¹, Д.В. Овчинников¹, Р.И. Глушаков¹

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Проведен анализ и обобщение данных литературных источников, характеризующих структурную организацию, регуляцию экспрессии и функциональную активность нейротрофического фактора мозга человека, который является одним из наиболее распространенных регуляторов биологических процессов в нервной системе. Отмечены результаты многочисленных исследований, демонстрирующих ассоциацию гена нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) с патофизиологией аффективных расстройств, подтвержден его вклад в развитие нейропластичности. Представлены результаты разработки дизайна пары праймеров и адаптации реакции амплификации региона BDNF длиной 433 пар нуклеотидов, содержащего полиморфный локус rs6265. Провели отбор эндонуклеазы рестрикции. Последовательность праймеров, их локализация и соотношение с сайтом рестрикции обеспечили разделение альтернативных аллелей, необходимое для успешной идентификации данного маркера. Использование предлагаемой техники позволило однозначно идентифицировать генотип в 38 исследуемых пробах цельной крови и выявить редкие аллельные варианты. Также во всех пробах установлена частота полиморфных вариантов rs6265 гена BDNF. Отмечено увеличение доли генотипов G/A и A/A полиморфизма rs6265 гена BDNF в группе обследованных, систематически подвергавшихся воздействию экстремальных факторов. Выявление людей с редко встречающимся генотипом A/A полиморфного локуса rs6265 гена BDNF имеет большое значение для системы мониторинга процессов долговременной потенциации, ведущих к развитию нейропсихической патологии. Доказана возможность реализации данного способа генотипирования в типовой лаборатории, использующей полимеразную цепную реакцию. Предложенный вариант полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин фрагментов рестрикции можно использовать как быструю, недорогую и надежную систему идентификации однонуклеотидных генетических полиморфизмов.

Ключевые слова: молекулярно-генетические маркеры; полимеразная цепная реакция; нейротрофический фактор головного мозга; точечное генотипирование; однонуклеотидный полиморфизм; нейрогенез; стресс; нейропластичность; методика идентификации полиморфизма rs6265.

Как цитировать:

Кутелев Г.Г., Криворучко А.Б., Трандина А.Е., Морозова Н.Е., Черкашин Д.В., Иванов А.М., Овчинников Д.В., Глушаков Р.И. разработка методики идентификации полиморфизма rs6265 в гене нейротрофического фактора мозга человека // Вестник Российской военно-медицинской академии. 2021. Т. 23, № 4. С. 63–70. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma80926>

DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma80926>
Scientific article

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE IDENTIFICATION OF RS6265 POLYMORPHISM IN THE HUMAN BRAIN NEUROTROPHIC FACTOR GENE

G.G. Kutelev¹, A.B. Krivoruchko¹, A.E. Trandina¹, N.E. Morozova², D.V. Cherkashin¹, A.M. Ivanov¹, D.V. Ovchinnikov¹, R.I. Glushakov¹

¹ Military Medical Academy named after S.M. Kirov of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT: The analysis and generalization of data from the literature sources characterizing the structural organization, regulation of expression, and functional activity of the neurotrophic factor of the human brain, which is one of the most common regulators of biological processes in the nervous system, is carried out. The results of numerous studies demonstrating the association of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene with the pathophysiology of the affective disorders are noted, and its contribution to the development of neuroplasticity is confirmed. The results of the design of a pair of primers and adaptation of the amplification reaction of the BDNF region with a length of 433 nucleotide pairs containing the polymorphic locus RS6265 are presented. Restriction endonuclease was selected. The sequence of primers, their localization, and correlation with the restriction site provided the separation of alternative alleles necessary for the successful identification of this marker. The use of the proposed technique made it possible to uniquely identify the genotype in 38 examined whole blood samples and identify the rare allelic variants. Also, the frequency of polymorphic variants of RS6265 of the BDNF gene was established in all the samples. There was an increase in the proportion of genotypes G/A and A/A of the RS6265 polymorphism of the BDNF gene in the group of examined systematically exposed to extreme factors. Identification of people with a rare A/A genotype of the RS6265 polymorphic locus of the BDNF gene is of a great importance for the monitoring system of long-term potentiation processes leading to the development of neuropsychic pathology. The possibility of implementing this method of genotyping in a typical laboratory using a polymerase chain reaction is proved. The proposed version of the polymerase chain reaction with the subsequent analysis of the polymorphism of the lengths of restriction fragments could be used as a fast, inexpensive, and reliable system for identifying single-nucleotide genetic polymorphisms.

Keywords: molecular genetic markers; polymerase chain reaction; brain neurotrophic factor; point genotyping; single nucleotide polymorphism; neurogenesis; stress; neuroplasticity; RS6265 polymorphism identification technique.

To cite this article:

Kutelev GG, Krivoruchko AB, Trandina AE, Morozova NE, Cherkashin DV, Ivanov AM, D.V. Ovchinnikov1, Glushakov RI. Development of a method for the identification of RS6265 polymorphism in the human brain neurotrophic factor gene. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2021;23(4):63–70. DOI: <https://doi.org/10.17816/brmma80926>

ВВЕДЕНИЕ

Нейротрофический фактор головного мозга (BDNF — от *англ.* brain-derived neurotrophic factor) играет важную роль в регуляции процессов нейрогенеза, формирования клеток определенной медиаторной специфичности, модификации нейронных сетей с образованием новых синапсов и перестройки синаптической передачи [1–3]. BDNF относится к семейству нейротрофинов, в головном мозге BDNF активен в гиппокампе, коре и базальной части переднего мозга — отделах, важных для обучения, приобретения и консолидации памяти, а также процессов, связанных с вознаграждением и когнитивными функциями [4–7]. Многочисленные ассоциативные исследования указывают на наличие взаимосвязи однонуклеотидных замен в гене BDNF с патогенезом аффективных расстройств [8, 9].

Ген BDNF человека локализован в регионе p14 11-й хромосомы, содержит 12 экзонов, 9 из которых имеют специфические промоторы (I–VIII 5'-экзоны, сплайсирующиеся (соединяющиеся) с общим 3'-экзоном IX; рис. 1).

Альтернативный сплайсинг приводит к 17 вариантам транскриптов с различными 5'- и 3'-нетранслируемыми областями, но все они имеют общую область (включая экзон X), кодирующую предшественника — proBDNF [10–12]. Эпигенетические факторы, включающие промоторные области, насыщенные CpG-островками, приводящие к метилированию гена и деацелированию гистонов (чаще H3 и H4 в промоторах I и IV), определяют разнообразие регуляции транскрипционной активности BDNF. Эти особенности могут приводить к изменению функциональной активности и метаболизма BDNF, способствуя развитию нейropsychической патологии [13, 14].

Ген BDNF играет значительную роль в развитии центральной нервной системы. Как было показано в исследовании у мышей с нокаутом этого гена, мутации вызывают потерю значительной части краниальных и спинномозговых периферических сенсорных и симпатических нейронов, вплоть до постнатальной летальности [15].

Одно из наиболее частых и изученных изменений нуклеотидной последовательности во 2-м экзоне гена BDNF — однонуклеотидный полиморфизм G196A, вызывающий аминокислотную замену (валин на метионин) в кодоне 66 (val66met), — rs6265 [16–18]. Генотип Val/Val представляет собой генотип «дикого типа», в то время как Val/Met и Met/Met отражают гетерозиготность

и гомозиготность соответственно. Полиморфизм BDNF Val66Met — относительно распространенный вариант, однако оценки его частоты варьируют в зависимости от этнической принадлежности [19]. В полногеномном поиске ассоциаций на выборке более 1 млн человек общая толерантность к риску и рискованному поведению была ассоциирована с однонуклеотидным полиморфизмом (SNP — от *англ.* single nucleotide polymorphism) rs6265 ($p = 3 \times 10^{-11}$) [20]. Полиморфизм Val66Met (rs6265) также связывают с множеством эффектов, влияющих на обучение и различные типы памяти [21].

K. Kennedy et al. [22] также изучали влияние BDNF rs6265 на множественные показатели памяти (элементарные, ассоциативные, предполагаемые, субъективные жалобы). Описана роль BDNF в развитии посттравматических стрессовых расстройств [23–25]. При этом не удалось подтвердить ассоциацию данного полиморфизма с развитием депрессии [26].

Несмотря на прогресс в развитии геномных технологий, процедура точечного определения однонуклеотидного полиморфизма последовательностей дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) с регистрацией накопления продуктов амплификации непосредственно в ходе реакции (ПЦР в реальном режиме времени) остается самой востребованной в лабораторной и исследовательской практике.

Вместе с тем данная методика генотипирования имеет ряд ограничений в применении и далеко не всегда позволяет однозначно определить присутствие каждого из аллелей исследуемой геномной вариации. Трудоемкость дизайна ключевых компонентов, длительность процесса оптимизации и необходимость проведения многократного сравнительного контроля эффективности в ряде случаев делают процесс определения генотипа недоступным для практических лабораторий.

В настоящее время методы генотипирования, основанные на ПЦР с детекцией продуктов реакции в режиме реального времени служат одними из наиболее часто используемых в сегменте низко- и среднепропускного скрининга SNP. Однако, несмотря на ряд преимуществ, технология ПЦР в режиме реального времени далеко не всегда способна обеспечить однозначную идентификацию присутствия каждого из аллелей и требует проведения тщательного контроля реальной разрешающей способности. При этом некоторые производители готовых наборов для выявления полиморфизмов в генах человека компенсируют недостатки дизайна олигонуклеотидов и субоптимальных условий проведения реакции

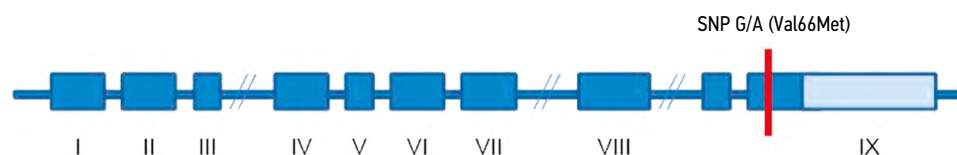


Рис. 1. Схематичное изображение структурной организации гена BDNF

Fig. 1. Schematic representation of the structural organization of the BDNF gene

применением альтернативных критериев анализа данных, тем самым искусственно занижая специфичность и увеличивая долю ошибочно интерпретированных результатов. Дополнительным фактором, ограничивающим массовое использование ПЦР в реальном времени для генетических исследований, могут быть высокая стоимость и длительность разработки тест-набора, гарантирующего успешную работу в рамках реализации поставленной исследователем задачи.

Данные факты определили необходимость разработки надежной, быстрой, простой в использовании и доступной для любой молекулярно-биологической лаборатории методики детекции полиморфизма BDNF rs6265 (Val66Met).

Цель исследования — разработка и апробация методики выявления полиморфизма rs6265 в гене BDNF, отличающейся простотой использования и эффективностью идентификации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы данные 38 обследуемых (36 мужчин и 2 женщин) в возрасте от 29 до 54 лет (средний возраст 38,9 года), которые были разделены на 2 группы. В основную группу вошли 26 человек в возрасте от 34 до 49 лет (средний возраст 30,4 года), профессиональная деятельность которых была связана с систематическим воздействием экстремальных факторов (таких как перепады барометрического давления, снижение атмосферного давления и парциального давления кислорода, шум, вибрация и т. д.). В состав контрольной группы, сопоставимой по возрасту с основной, вошли 12 человек, у которых работа исключала столкновение с экстремальными факторами.

Статистический анализ и описание результатов исследования проводили с помощью программы MS Excel.

Для проведения анализа использовали свежую цельную кровь, взятую у испытуемых в вакуумную систему с 6% этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Образцы были подвергнуты процедуре селективного лизиса эритроцитов с помощью раствора гемолитика. Гемолитик является селективно гипотоническим только по отношению к эритроцитам, и осмотическое давление приводит к разрыву их клеточной мембраны, при этом интактные лейкоциты формируют осадок на дне пробирки.

Экстракцию ДНК из лейкоцитов периферической крови выполняли путем лизирования клеток и спиртового осаждения согласно общепринятой методике. Концентрация выделенной ДНК в пробах варьировала от 37 до 176 нг/мкл. Оптимальное количество ДНК, необходимое для постановки ПЦР, составляло 10–30 нг.

Исследование варибельного участка гена BDNF rs6265 (Val66Met) проведено с помощью ПЦР с анализом полиморфизма длин рестриционных фрагментов.

Для дизайна праймеров, фланкирующих (ограничивающих) регион rs6265, использовали последовательность гена BDNF длиной 433 пар нуклеотидов (п. н.). Выбор прямого и обратного праймеров производили, используя комбинацию данных из литературных источников [27, 28] и специализированных веб-приложений. В результате для амплификации интересующего нас фрагмента гена BDNF был выбран прямой праймер F (5'- GTTCCACCAGGTGAGAAGAGTG-3') и обратный праймер R (5'- ACTACTGAGCATCACCTGGA-3'), рис. 2. Расчетная температура плавления олигонуклеотидов составляла 65,5 и 65,7 °C соответственно. Праймеры не образуют стабильных вторичных структур. Присутствует 3' GC clamp. Длина амплифицируемого фрагмента 316 п. н.

Для ферментативного гидролиза полиморфного участка G > A rs6265 (см. рис. 2) можно использовать эндонуклеазу рестрикции Eco72I фирмы ThermoFisher Scientific (Соединенные Штаты Америки — США) или ее изоизомеры (PmlI, AclI, PspCI и др.).

Исходя из принципов экономической целесообразности, нами была выбрана эндонуклеаза рестрикции PspCI фирмы «СибЭнзим» (Россия). Данный фермент специфически взаимодействует с последовательностью нуклеотидов CAC[^]GTG (см. рис. 2) и катализирует реакцию гидролиза ДНК, расщепляя нуклеотидную цепь внутри участка узнавания. После рестрикции по данному сайту фрагмент ДНК общей длиной 316 п. н. разделится на два по 217 и 99 п. н. (рис. 3).

При дизайне праймеров старались добиться максимально возможной на данном участке ДНК разницы в длине фрагментов после гидролиза для упрощения визуальной дискриминации аллелей при разделении продуктов реакции в агарозном геле.

В том случае, если произойдет однонуклеотидная замена G/A, сайт узнавания будет модифицирован, гидролиза ДНК не будет, фрагмент длиной 316 п. н. останется целым. Для амплификации целевого фрагмента использовали готовую смесь на основе Taq-полимеразы с «горячим стартом» qPCRmix-HS фирмы «Евроген» (Россия) и следующие условия проведения ПЦР. Предварительная денатурация при 95 °C (5 мин). 30 циклов амплификации: денатурация при 95 °C (30 с), отжиг с градиентом от 62 до 52 °C (30 с), элонгация при 72 °C (30 с). Заключительный синтез при 72 °C (7 мин).

С целью экспериментального определения оптимальной температуры отжига праймеров, зачастую значительно отличающейся от расчетной, провели предварительную ПЦР с температурой отжига 62; 61,2; 60; 58,1; 55,8; 53,9; 52,7 и 52 °C. Амплификацию осуществляли в термоциклере «Т-100» фирмы «Bio-Rad» (США) с функцией температурного градиента.

Смесь для реакции объемом 25 мкл включала: 5 мкл готовой 5 × ПЦР-смеси, 2 мкл ДНК, по 1 мкл прямого и обратного праймеров рабочей концентрации 0,4 и 16 мкл безнуклеазной воды высокой степени очистки.



Рис. 2. Локализация полиморфного участка G > A и сайта рестрикции в целевом фрагменте гена BDNF
Fig. 2. Localization of the polymorphic site G > A and the restriction site in the target fragment of the BDNF gene

Для проведения 8 независимых реакций амплификации использовали одинаковые компоненты смеси и условия термочиклирования, за исключением температуры отжига олигонуклентидов. После проведения ПЦР с указанными условиями продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле с окраской бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом излучении на системе гель-документирования Gel Doc XR+ фирмы «Bio-Rad» (США). В результате эксперимента оптимальной температурой гибридизации олигонуклеотидов можно признать 58,1 °C. Таким образом, окончательные условия амплификации целевого фрагмента были скорректированы.

Для выявления однонуклеотидной замены rs6265 ПЦР-продукт, полученный для каждого обследуемого, подвергали ферментативному гидролизу с 10 ед. эндонуклеазы рестрикции PspCI на протяжении 3 ч. В процессе первоначальной инкубации с этим ферментом был выявлен любопытный факт. Оказалось, что в отличие от Eco72I фирмы ThermoFisher Scientific (США), гидролизующего двухцепочечную ДНК непосредственно в смеси после амплификации, эндонуклеаза PspCI компании «СибЭнзим» полностью ингибируется продуктами ПЦР. Уточнение данного факта потребовало введения в протокол дополнительной очистки реакционной смеси после ПЦР. Очистку выполняли с использованием набора Cleanup Mini фирмы «Евроген» (Россия). После отработки условий рестрикции удалось добиться четкого разделения аллелей полиморфизма rs6265 BDNF G > A (рис. 4).

Полученные в результате амплификации с последующей очисткой двухцепочечной ДНК из реакционной смеси и ферментативным гидролизом фрагменты анализировали с помощью микрочипового электрофореза с использованием системы MultiNA фирмы Shimadzu

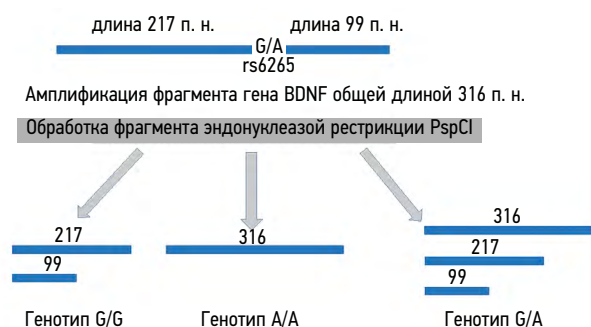


Рис. 3. Схема детекции полиморфного варианта rs6265, основанная на анализе различий длины рестрикционных фрагментов

Fig. 3. The detection scheme of the polymorphic variant RS6265, based on the analysis of the differences in the length of restriction fragments

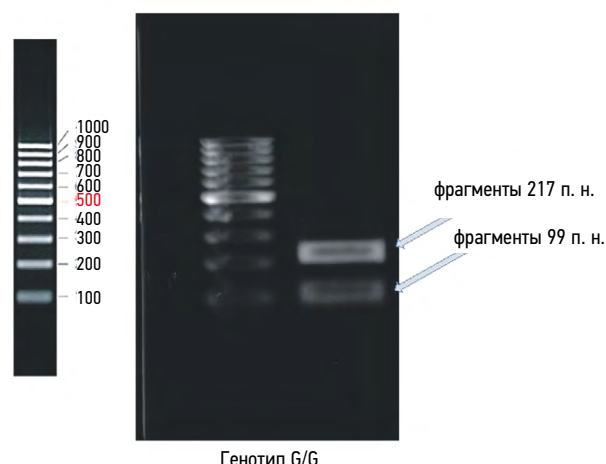


Рис. 4. Результат определения генотипа G/G путем разделения фрагментов рестрикции в 1,5% агарозном геле
Fig. 4. Result of G/G genotype determination by separation of restriction fragments in 1.5% agarose gel

(Япония). Валидацию описанной технологии идентификации SNP проводили с помощью секвенирования ДНК с использованием автоматического генетического анализатора Applied Biosystems 3500 фирмы Thermo Fisher Scientific (США). Расхождений в определении генотипов всех исследованных образцов не выявлено.

Результаты и их обсуждение. Данные полученной системы генотипирования были протестированы на 38 образцах ДНК включенных в обследование. При исследовании генетического полиморфизма rs6265 гена BDNF у 38 участников частоты аллелей распределились следующим образом (рис. 5).

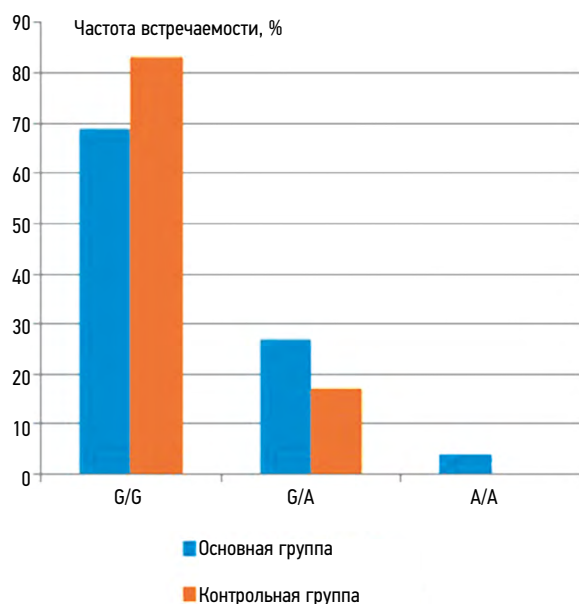


Рис. 5. Частота выявления полиморфных вариантов rs6265 гена BDNF у исследуемых групп

Fig. 5. Frequency of detection of polymorphic variants of rs6265 of the BDNF gene in the studied groups

Наличие генотипов G/A и A/A ассоциировано с влиянием на общие когнитивные способности, предрасположенностью к нарушению памяти, расстройствам пищевого поведения (например, нервная анорексия и нервная булимия), биполярным аффективным расстройством, тревожным расстройством, болезнью Альцгеймера, Паркинсона и защитным эффектом при обсессивно-компульсивном расстройстве [8, 9]. Отмечено увеличение доли генотипов G/A и A/A полиморфизма rs6265 гена BDNF в группе обследованных, систематически подвергавшихся воздействию экстремальных факторов.

В результате проведенного исследования нами были отработаны условия модификации «классической» ПЦР-методики, позволяющие проводить однозначную дискриминацию аллелей полиморфного варианта G196A гена BDNF. Использование предлагаемой техники позволило однозначно идентифицировать генотип во всех 38 исследуемых пробах и выявить редкие аллельные варианты. Выявление людей с редко встречающимся генотипом A/A полиморфного локуса rs6265 гена BDNF имеет большое значение для системы мониторинга процессов долговременной потенциации, ведущих к развитию нейropsychической патологии. Данный способ генотипирования может быть практически реализован в типовой ПЦР-лаборатории с минимальными материальными затратами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложенный вариант полимеразной цепной реакции с последующим анализом полиморфизма длин фрагментов рестрикции можно использовать как быструю, недорогую и надежную систему идентификации однонуклеотидных генетических полиморфизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lledo P., Alonso M., Grubb M. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits // *Nat Rev Neurosci.* 2006. Vol. 7, No. 3. P. 179–193. DOI: 10.1038/nrn1867
2. Shors T., Miesegaes G., Beylin A., et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories // *Nature.* 2001. Vol. 410, No. 6826. P. 372–376. DOI: 10.1038/35066584
3. Deng W., Saxe M., Gallina I., Gage F. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain // *J Neurosci.* 2009. Vol. 29, No. 43. P. 13532–13542. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3362-09.2009
4. Snyder J., Hong N., McDonald R., Wojtowicz J. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory // *Neuroscience.* 2005. Vol. 130, No. 4. P. 843–852. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.009
5. Yamada K., Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes // *J Pharmacol Sci.* 2003. Vol. 91, No. 4. P. 267–270. DOI: 10.1254/jphs.91.267
6. Mizui T., Ishikawa Y., Kumanogoh H., et al. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015. Vol. 112, No. 23. P. 3067–3074. DOI: 10.1073/pnas.1422336112
7. Harrisberger F., Smieskova R., Schmidt A., et al. BDNF Val66Met polymorphism and hippocampal volume in neuropsychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis // *Neurosci Biobehav Rev.* 2015. Vol. 55. P. 107–118. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.04.017
8. Thompson R., Weickert C., Wyatt E., Webster M. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders // *J Psychiatry Neurosci.* 2011. Vol. 36, No. 3. P. 195–203. DOI: 10.1503/jpn.100048
9. Gonul A., Akdeniz F., Taneli F., et al. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients // *Eur Arch Psychiatry Clin. Neurosci.* 2005. Vol. 255, No. 6. P. 381–386. DOI: 10.1007/s00406-005-0578-6
10. Boule F., van den Hove D., Jakob S., et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders // *Mol Psychiatry.* 2012. Vol. 17, No. 6. P. 584–596. DOI: 10.1038/mp.2011.107
11. Wang M., Xie Y., Qin D. Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases // *Brain Res Bull.* 2021. Vol. 166. P. 172–184. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.005

12. Li J.Y., Liu J., Manaph N.P.A., et al. ProBDNF inhibits proliferation, migration and differentiation of mouse neural stem cells // *Brain Res.* 2017. Vol. 1668. P. 46–55. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.05.013
13. Karpova N. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity // *Neuropharmacology.* 2014. Vol. 76. P. 709–718. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.002
14. Ernfors P., Kucera J., Lee K.F., et al. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice // *Int J Dev Biol.* 1995. Vol. 39, No. 5. P. 799–807.
15. Ernfors P., Kucera J., Lee K., et al. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice // *Int J Dev Biol.* 1995. Vol. 39, No. 5. P. 799–807.
16. Sanwald S., Montag C., Kiefer M. Depressive emotionality moderates the influence of the BDNF Val66Met polymorphism on executive functions and on unconscious semantic priming // *J Mol Neurosci.* 2020. Vol. 70, No. 5. P. 699–712. DOI: 10.1007/s12031-020-01479-x
17. Zhao Y., Zhu R., Xiao T., Liu X. Genetic variants in migraine: a field synopsis and systematic re-analysis of meta-analyses // *J Headache Pain.* 2020. Vol. 21, No. 1. P. 13. DOI: 10.1186/s10194-020-01087-5
18. Middeldorp C.M., Slof-Op't Landt M.C., Medland S.E., et al. Anxiety and depression in children and adults: influence of serotonergic and neurotrophic genes? // *Genes Brain Behav.* 2010. Vol. 9, No. 7. P. 808–816. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2010.00619
19. Petryshen T., Sabeti P., Aldinger K., et al. Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene // *Mol Psychiatry.* 2010. Vol. 15, No. 8. P. 810–815. DOI: 10.1038/mp.2009.24
20. Linnér R., Biroli P., Kong E., et al. Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetic influences // *Nature Genetics.* 2019. Vol. 51, No. 2. P. 245–257. DOI: 10.1038/s41588-018-0309-3
21. 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, No. 2. P. 257–269. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00035-7
22. Kennedy K., Reese E., Horn M., et al. BDNF val66met polymorphism affects aging of multiple types of memory // *Brain Res.* 2015. Vol. 1612. P. 104–117. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.09.044
23. Notaras M., van den Buuse M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders // *Mol Psychiatry.* 2020. Vol. 25, No. 10. P. 2251–2274. DOI: 10.1038/s41380-019-0639-2
24. Carver C., Johnson S., Joormann J., et al. Childhood adversity interacts separately with 5-HTTLPR and BDNF to predict lifetime depression diagnosis // *J Affect Disord.* 2011. Vol. 132, No. 1–2. P. 89–93. DOI: 10.1016/j.jad.2011.02.001
25. Chen J., Li X., McGue M. Interacting effect of BDNF Val66Met polymorphism and stressful life events on adolescent depression // *Genes Brain Behav.* 2012. Vol. 11, No. 8. P. 958–965. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2012.00843.x
26. Gyekis J., Yu W., Dong S., et al. No association of genetic variants in BDNF with major depression: A meta- and gene-based analysis // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2013. Vol. 162, No. 1. P. 61–70. DOI: 10.1002/ajmg.b.32122
27. Sheikh H., Hayden E., Kryski K., et al. Genotyping the BDNF rs6265 (val66met) polymorphism by one-step amplified refractory mutation system PCR // *Psychiatric Genetics.* 2010. Vol. 20, No. 3. P. 109–112. DOI: 10.1097/YPG.0b013e32833a2038
28. Iqbal M., Yaqoob T., Ali S., Khan A. A functional polymorphism (rs6265, G > A) of brain-derived neurotrophic factor gene and breast cancer: An association study // *Breast Cancer: Basic Clin Res.* 2019. Vol. 13. P. 1178223419844977. DOI: 1178223419844977

REFERENCES

1. Lledo P., Alonso M., Grubb M. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(3):179–193. DOI: 10.1038/nrn1867
2. Shors T., Miesegaes G., Beylin A., et al. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature.* 2001;410(6826):372–376. DOI: 10.1038/35066584
3. Deng W., Saxe M., Gallina I., Gage F. Adult-born hippocampal dentate granule cells undergoing maturation modulate learning and memory in the brain. *J Neurosci.* 2009;29(43):13 532–13 542. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3362-09.2009
4. Snyder J., Hong N., McDonald R., Wojtowicz J. A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience.* 2005;130(4):843–852. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.10.009
5. Yamada K., Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci.* 2003;91(4):267–270. DOI: 10.1254/jphs.91.267
6. Mizui T., Ishikawa Y., Kumanogoh H., et al. BDNF pro-peptide actions facilitate hippocampal LTD and are altered by the common BDNF polymorphism Val66Met. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(23):3067–3074. DOI: 10.1073/pnas.1422336112
7. Harrisberger F., Smieskova R., Schmidt A., et al. BDNF Val66Met polymorphism and hippocampal volume in neuropsychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2015;55:107–118. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.04.017
8. Thompson R., Weickert C., Wyatt E., Webster M. Decreased BDNF, trkB-TK+ and GAD67 mRNA expression in the hippocampus of individuals with schizophrenia and mood disorders. *J Psychiatry Neurosci.* 2011;36(3):195–203. DOI: 10.1503/jpn.100048
9. Gonul A., Akdeniz F., Taneli F., et al. Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2005;255(6):381–386. DOI: 10.1007/s00406-005-0578-6
10. Boule F., van den Hove D., Jakob S., et al. Epigenetic regulation of the BDNF gene: implications for psychiatric disorders. *Mol Psychiatry.* 2012;17(6):584–596. DOI: 10.1038/mp.2011.107
11. Wang M., Xie Y., Qin D. Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull.* 2021;166:172–184. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.005
12. Li JY, Liu J, Manaph NPA, et al. ProBDNF inhibits proliferation, migration and differentiation of mouse neural stem cells. *Brain Res.* 2017;1668:46–55. DOI: 10.1016/j.brainres.2017.05.013
13. Karpova N. Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity. *Neuropharmacology.* 2014;76:709–718. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.002
14. Ernfors P., Kucera J., Lee KF, et al. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol.* 1995;39(5):799–807.

15. Ernfors P, Kucera J, Lee K, et al. Studies on the physiological role of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in knockout mice. *Int J Dev Biol.* 1995;39(5):799–807.
16. Sanwald S, Montag C, Kiefer M. Depressive emotionality moderates the influence of the BDNF Val66Met polymorphism on executive functions and on unconscious semantic priming. *J Mol Neurosci.* 2020;70(5):699–712. DOI: 10.1007/s12031-020-01479-x
17. Zhao Y, Zhu R, Xiao T, Liu X. Genetic variants in migraine: a field synopsis and systematic re-analysis of meta-analyses. *J Headache Pain.* 2020;21(1):13. DOI: 10.1186/s10194-020-01087-5
18. Middeldorp CM, Slof-Op't Landt MC, Medland SE, et al. Anxiety and depression in children and adults: influence of serotonergic and neurotrophic genes? *Genes Brain Behav.* 2010;9(7):808–816. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2010.00619
19. Petryshen T, Sabeti P, Aldinger K, et al. Population genetic study of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Mol Psychiatry.* 2010;15(8):810–815. DOI: 10.1038/mp.2009.24
20. Linnér R, Biroli P, Kong E, et al. Genome-wide association analyses of risk tolerance and risky behaviors in over 1 million individuals identify hundreds of loci and shared genetic influences. *Nature Genetics.* 2019;51(2):245–257. DOI: 10.1038/s41588-018-0309-3
21. 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;112(2):257–269. DOI: 10.1016/s0092-8674(03)00035-7
22. Kennedy K, Reese E, Horn M, et al. BDNF val66met polymorphism affects aging of multiple types of memory. *Brain Res.* 2015;1612:104–117. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.09.044
23. Notaras M, van den Buuse M. Neurobiology of BDNF in fear memory, sensitivity to stress, and stress-related disorders. *Mol Psychiatry.* 2020;25(10):2251–2274. DOI: 10.1038/s41380-019-0639-2
24. Carver C, Johnson S, Joormann J, et al. Childhood adversity interacts separately with 5-HTTLPR and BDNF to predict lifetime depression diagnosis. *J Affect Disord.* 2011;132(1–2):89–93. DOI: 10.1016/j.jad.2011.02.001
25. Chen J, Li X, McGue M. Interacting effect of BDNF Val66Met polymorphism and stressful life events on adolescent depression. *Genes Brain Behav.* 2012;11(8):958–965. DOI: 10.1111/j.1601-183X.2012.00843.x
26. Gyekis J, Yu W, Dong S, et al. No association of genetic variants in BDNF with major depression: A meta- and gene-based analysis. *Am J Med Genet. Part B: Neuropsychiatric Genet.* 2013;162(1):61–70. DOI: 10.1002/ajmg.b.32122
27. Sheikh H, Hayden E, Kryski K, et al. Genotyping the BDNF rs6265 (val66met) polymorphism by one-step amplified refractory mutation system PCR. *Psychiatric Genetics.* 2010;20(3):109–112. DOI: 10.1097/YPG.0b013e32833a2038
28. Iqbal M, Yaqoob T, Ali S, Khan A. A functional polymorphism (rs6265, G > A) of brain-derived neurotrophic factor gene and breast cancer: An association study. *Breast Cancer: Basic Clin. Res.* 2019;13. <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1178223419844977> (access date: 11.02.2021). DOI: 1178223419844977

ОБ АВТОРАХ

***Геннадий Геннадьевич Кутелев**, кандидат медицинских наук; e-mail: gena08@yandex.ru; ORCID: 0000-0002-6489-9938; SPIN-код: 5139-8511

Александр Борисович Криворучко, кандидат медицинских наук; e-mail: krab25@mail.ru; ORCID: 0000-0003-2035-4888; SPIN-код: 1324-0239

Александра Евгеньевна Трандина, e-mail: sasha-trandina@rambler.ru; ORCID: 0000-0003-1875-1059; SPIN-код: 6089-3495

Наталья Евгеньевна Морозова, кандидат биологических наук; e-mail: natusmorozovna@gmail.ru; ORCID: 0000-0002-3001-2593; SPIN-код: 4716-8586

Дмитрий Викторович Черкашин, доктор медицинских наук, профессор; e-mail: cherkashin_dmitr@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1363-6860; SPIN-код: 2781-9507

Андрей Михайлович Иванов, доктор медицинских наук, профессор; e-mail: iamvma@mail.ru; SCOPUS: 55867182100; ORCID: 0000-0002-8899-7524, SPIN-код: 6971-1744

Дмитрий Валерьевич Овчинников, кандидат медицинских наук, доцент; e-mail: dv.ovchinnikov-vma@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8408-5301; SCOPUS: 36185599800; SPIN-код: 5437-3457

Руслан Иванович Глушаков, кандидат медицинских наук; e-mail: glushakovruslan@gmail.ru; ORCID: 0000-0002-0161-5977; SCOPUS: 55263592100; SPIN-код: 6860-8990

AUTHORS INFO

***Gennady G. Kutelev**, candidate of medical sciences; e-mail: gena08@yandex.ru ORCID: 0000-0002-6489-9938, SPIN code: 5139-8511

Alexander B. Krivoruchko, candidate of medical sciences; e-mail: krab25@mail.ru ORCID: 0000-0003-2035-4888; SPIN code: 1324-0239

Alexandra E. Trandina, ORCID: 0000-0003-1875-1059; SPIN code: 6089-3495; e-mail: sasha-trandina@rambler.ru

Natalia E. Morozova, candidate of biology sciences; e-mail: natusmorozovna@gmail.ru; ORCID 0000-0002-3001-2593; SPIN code: 4716-8586

Dmitriy V. Cherkashin, doctor of medical sciences, professor; e-mail: cherkashin_dmitr@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1363-6860; SPIN code: 2781-9507

Andrey M. Ivanov, doctor of medical sciences, professor; e-mail: iamvma@mail.ru; ORCID 0000-0002-8899-7524, SCOPUS: 55867182100; SPIN code: 6971-1744

Dmitrii V. Ovchinnikov, candidate of medical sciences, associate professor; e-mail: dv.ovchinnikov-vma@yandex.ru; ORCID: 0000-0001-8408-5301; SCOPUS: 36185599800; SPIN code: 5437-3457

Ruslan I. Glushakov, candidate of medical sciences; e-mail: glushakovruslan@gmail.ru; ORCID: 0000-0002-0161-5977; SCOPUS: 55263592100; SPIN code: 6860-8990

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author