
Porucha barvocitu u alkoholiků a její souvislost s polymorfismem genu pro BDNF

Šerý O., Lochman J., Zvolský P.¹, Hlinomazová Z.², Novotný M.¹

Laboratoř neurobiologie a molekulární psychiatrie, Laboratoře molekulární fyziologie, Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta MU, Brno,
ředitel Ústavu biochemie doc. Ing. M. Mandl, CSc.
Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN, Praha,
přednosta prof. MUDr. J. Raboch, DrSc. ¹
Oční klinika FN Brno,
přednostka prof. MUDr. E. Vlková, CSc.²

SOUHRN

Alkoholismus způsobuje nejen poškození mozku, ale může způsobit také poruchy barvocitu. V naší asociační studii genetických dispozic k alkoholismu na 167 osobách závislých na alkoholu a 289 kontrolních jedincích jsme studovali vztah mezi kandidátními geny a alkoholismem. U osob zúčastněných ve studii jsme sledovali více faktorů, včetně poruchy barvocitu. Překvapivě jsme po statistické analýze zjistili, že 47,9 % alkoholiků trpí poruchou barvocitu a navíc že tato porucha barvocitu má souvislost s polymorfismem genu pro BDNF (brain-derived neurotrophic factor). Je dobře známo, že BDNF hraje úlohu v neurovývoji sítnice a v ochraně fotoreceptorů před apoptózou. Možná role genu pro BDNF na vzniku poruchy barvocitu u alkoholiků je diskutována.

Klíčová slova: alkoholismus, BDNF, sítnice, barvocit, apoptóza, GABA.

SUMMARY

Šerý O., Lochman J., Zvolský P., Hlinomazová Z., Novotný M.: Color Vision Deficiency in Alcoholics and its Relationship with the BDNF Polymorphism

Alcoholism induces the brain damage but it may also cause the color vision deficiency. In our association study of genetic dispositions to the alcoholism in 167 alcoholics and 289 non-alcoholic controls, we studied a relationship between candidate genes and alcoholism. In all subjects involved in this study many factors, e.g. color vision deficiencies, were examined. Surprisingly, after the statistical analysis, we found that 47.9% of alcoholics have problems with color vision deficiency and moreover that this color vision deficiency is in a relationship with the polymorphism of BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) gene. It is well known that BDNF plays a role in the neurodevelopment of retina and in the protection of photoreceptors from apoptosis. Potential role of BDNF gene in the color vision deficiency in alcoholics is discussed.

Key words: alcoholism, BDNF, retina, vision, color, apoptosis, GABA.

Čes, a slov. Psychiat., 104, 2008, No. 3, pp. 115–119.

ÚVOD

V našem předchozím výzkumu jsme sledovali vztah mezi polymorfismy kandidátních genů a závislostí na alkoholu [8, 9]. Kromě analýzy DNA a diagnostiky dle MKN-10 a DSM-IV byla u zkoumaných osob hodnocena také osobní a rodinná anamnéza a mimo jiné i testy prostorového vidění a test poruchy barvocitu pomocí Velhagenovy pseudoisochromatické tabulky. Při vyhodnocování výsledků jsme zjistili vztah mezi genem pro BDNF a poruchou barevného vidění u osob trpících alkoholismem.

Lidské oko je schopno rozlišovat různé barvy

v oblasti vlnových délek mezi 380 a 760 nm. Barva je určena vlnovou délkou té části spektra, která předmětem prochází nebo se od něj odráží. Tuto schopnost mají v oku čípky umístěné ve fovea centralis a potřebují k tomu určitou prahovou hladinu osvětlení. Smíšením tří základních tzv. primárních spektrálních barev - červené, zelené a modré - vzniká barevná škála. Změnou poměru těchto barev můžeme dostat jakýkoliv barevný odstín, což je základem tzv. trichromatického vidění. Podle Youngovy, Helmholtzovy a Lomonosovy teorie předpokládáme v sítnici existenci tří druhů receptorů pro barvy. Lidské oko je schopno rozeznat rozdíl jednoho nanometru ve viditelné části spektra. Nedokáže však rozlišit zda se jedná o barvu monochroma-

tickou o dané vlnové délce, nebo směs vlnových délek – smíšené světlo – které dají vznik téže barvě.

Existují jedinci, kteří nerozeznají žádnou barvu – vnější svět vnímají jen v odstínech šedi jako na černobílé fotografii a označují se jako monochromati. Částečná ztráta barvocitu spočívá v tom, že v sítnici chybí mechanismus pro vnímání jedné ze tří základních barev. Jedinci s touto vadou se nazývají dichromati. Ztráta schopnosti vnímat červenou barvu se nazývá protanopie, vnímat zelenou barvu deuteranopie a modrou tritanopie. Ztráta vnímání určité základní barvy nemusí být úplná – jedná se o anomálii jejího vnímání (protanomalie, deuteranomalie, tritanomalie). Porucha barvocitu může být vrozená (primární). Postihuje častěji muže (až 8% populace), u žen se udává porucha barevného vidění v 0,5 %. Zrakové funkce a nález na sítnici jsou u těchto poruch fyziologické. Stav je stabilní a nedá se ovlivnit léčbou.

Některá oční onemocnění, zvláště choroby zrakového nervu a sítnice, jsou doprovázena poruchou barvocitu (sekundární). Sekundární změna barvocitu je proměnlivá a může se po odeznění akutní fáze onemocnění upravit. K této skupině chorob se řadí i alkoholová amblyopie. Ta je typická chronickým průběhem, sníženou zrakovou ostrostí a mlhavým viděním. Při vyšetřování zorného pole je zřetelná porucha vnímání zelené a červené barvy. Při alkoholové závislosti vzniká relativní skotom, který se při zvyšující se závislosti může změnit v absolutní a současně se mění i nález na papile zrakového nervu v podobě parciální atrofie optiku.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) je členem rodiny tzv. neurotrofinů, které se účastní přežívání a diferenciace dopaminových neuronů ve vyvíjejícím se mozku. V současnosti se již předpokládá, že růstové faktory se neúčastní pouze vývoje centrálního nervového systému, ale mají důležité funkce také v dospělém mozku [4]. Bylo zjištěno, že alkohol, psychostimulancia a anti-depresiva zvyšují hladiny BDNF v mozku. Předpokládá se, že BDNF může mít terapeutický efekt při léčbě psychofarmaky a navíc se může podílet na patogenezi hyperkinetické poruchy a schizofrenie. Mezi nejčastěji studované polymorfismy genu pro BDNF patří funkční polymorfismus Val66Met, který byl opakovaně asociován se změnami objemu některých částí mozku osob trpících schizofrenií [2] a s kognitivními schopnostmi studovaných osob [1].

Fotoreceptory mohou být chráněny před apoptózou (buněčnou smrtí) aplikací neuroprotektivních látek, jako je např. BDNF. Fotoreceptory neexprimují BDNF. Na druhou stranu BDNF vylučovaný z Müllerových buněk zvyšuje produkci ciliárního neurotrofického faktoru (CNTF) a základního fibroblastového růstového faktoru (bFGF), což může podporovat přežívání fotoreceptorů [12].

V pokusech na potkanech nižší hladiny BDNF překvapivě zapříčinily ochranu fotoreceptorů před poškozením světlem. Úloha BDNF v sítnici není doposud jednoznačně objasněna a bude zřejmě záviset na dalších faktorech.

Cílem této práce bylo zjistit pomocí asociační studie, zda existují vztahy mezi polymorfismem Val66Met genu pro BDNF, alkoholismem a poruchou barvocitu.

METODIKA

Soubory osob

Soubor osob závislých na alkoholu tvořilo celkem 167 mužů české národnosti ve věku 18 až 70 let, kteří podepsali informovaný souhlas. Pacienti závislí na alkoholu byli vybíráni na protialkoholních odděleních VFN v Praze, Apolinářská, a ženském protialkoholním oddělení v Lojovicích, dále na protialkoholních odděleních v Psychiatrické léčebně v Praze-Bohnicích, v Psychiatrické léčebně v Jihlavě a v Červeném Dvoře. Závislost na alkoholu byla diagnostikována na základě kritérií DSM-IV a MKN-10. S každou osobou byl vypracován dotazník MAST (Michigan Alcoholism Screening Test) [7] pro zjištění míry závislosti.

Kontrolní soubor zahrnoval 289 mužů. Podmínkou pro zařazení do studie do kontrolní skupiny byl věk 18 – 70 let, česká národnost, podepsání informovaného souhlasu, vyloučení současně i dřívější závislosti na alkoholu. Další podmínkou bylo nekuřáctví a nezneužití psychoaktivních látek v průběhu života. Osoby v kontrolní skupině nebyly vzájemně příbuzné. Z důvodu síly statistických výpočtů byly do kontrolního souboru přidány osoby s dříve známou poruchou barvocitu, takže se v kontrolním souboru vyskytovalo celkem 23,9 % osob s poruchou barvocitu.

Studie byla prováděna v rámci dvou výzkumných projektů IGA MZČR a byla schválena Etickou komisí VFN v Praze.

Vyšetřování barevného vidění

K diagnostice barevného vidění byly použity Velhagenovy pseudoisochromatické tabulky, které se běžně používají v rutinní klinické praxi [11]. Jsou sestaveny z různobarevných skvrn stejné velikosti a světlosti, ale odlišných barevných odstínů, které vytvářejí písmena, číslice nebo geometrické tvary. Oko s normálním barvocitem je bez obtíží přečte. Oko s poruchou barvocitu některé znaky rozezná, jiné nerozezná. Tabulky jsou orientační a nedovolují přesné kvantitativní určení poruchy. Vyšetření bylo prováděno za stabilního osvětlení, s korekcí do dálky a ze vzdálenosti 1 m. Vyšetřovaným osobám nebylo povoleno naklánění hlavy, přibližování k tabulkám nebo pohled ze stran. U alkoholiků byly testy prováděny minimálně po sedmi dnech po odeznění ebriety. Vzhledem ke sku-

tečnosti, že se ve studii vyskytuje velké množství pacientů z různých částí České republiky z různých psychiatrických klinik a léčen, nebylo možné zabezpečit u nich vyšetření vizu, refrakce, očního pozadí a centrálního skotomu.

Genetické zpracování

V rámci studie genetické podmíněnosti dispozic k alkoholismu jsme v naší práci studovali následující polymorfismy: TaqI A genu pro DRD2 (dopaminový receptor D2), Val158Met genu pro COMT (catechol-O-metyltransferázu), I/D genu pro ACE (angiotensinkonvertázu), – 174 genu pro IL-6 (interleukin 6), delta 32 genu pro CCR5 (chemokinový receptor 5), -308 TNF alfa (tumor nekrotizující faktor alfa), M235T genu pro AGT (angiotensinogen), A/G ve 13. intronu genu pro MAO-B (monoaminoxidázu B), -330 genu pro IL-2 (interleukin 2), A118G (Asn40Asp) genu pro Mu opioidní receptor, 196 G/A (val66met) genu pro BDNF (Brain derived neurotrophic factor), 40-bp VNTR genu pro DAT1 (dopaminový transportér), polymorfismus tsc1189131 a polymorfismus tsc 0598556.

Jednotlivé vzorky genomické DNA byly izolovány z krve za použití izolačního kitu UltraClean BloodSpin Kit (MoBio, USA). Detekce polymorfismů byla provedena podle metodik navržených v Laboratoři neurobiologie a molekulární psychiatrie. Pro RT-PCR reakci polymorfismu 196G/A (Val66Met) genu pro BDNF byly použity primery BDNF1 5' - tca aga ggc ttg aca tca ttg- 3' a BDNF2 5' - tca ttg ggc cga act ttc - 3'. K detekci alel byl využit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mixu, 0,3 µl 40x Assay mixu a 5 µl genomové DNA. Reakce i detekce byly prováděny pomocí automati-

zovaného systému PCR-Real Time AB7300 (Applied Biosystems). Po počáteční denaturaci trvající 2 minuty při 50 °C a 10 minutách při 95°C byla DNA amplifikována v tříkrokových cyklech 40x: denaturace 15 s při 92 °C, annealing 60 s při 60 °C a extenze 32 s při 72 °C. Odlišné genotypy byly detekovány pomocí navázaných sond, data byla uložena v systému počítače.

Statistické zpracování

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno programem CSS Statistica, verze 7 (StatSoft, USA). Byly vytvořeny kontingenční tabulky s počty osob pro jednotlivé genotypy. Z těchto tabulek se dále vycházelo při výpočtu genotypových a alelických frekvencí sledovaných polymorfismů. K přehlednému znázornění vztahů mezi sledovanými proměnnými byl použit Spearmanův korelační koeficient. Pro výpočet korelačních tabulek byl použit software CSS Statistica (verze 7). Výpočet rozdílu mezi genotypovými frekvencemi sledovaných polymorfismů byl proveden pomocí χ^2 testu, výpočet rozdílu mezi alelickými frekvencemi polymorfismů byl proveden pomocí Fisher-exact testu. Za signifikantní výsledek sledovaných genotypových a alelických frekvencí studovaného polymorfismu byla pokládána hladina pravděpodobnosti $p < 0,05$.

VÝSLEDKY

Rozdíl v alelických frekvencích mezi osobami závislými na alkoholu s porušeným barvocitem a osobami závislými na alkoholu s normálním barvocitem je statisticky signifikantní ($P < 0,01$) (tab. 1). Také genotypové frekvence jsou mezi těmito dvěma soubory statisticky významně odlišné ($P < 0,01$).

Tab. 1. Srovnání mezi alkoholiky s normálním barvocitem (Norm) a alkoholiky s porušeným barvocitem (Barv).

Skupina	Počet osob s daným genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely A	Fisher exact test	X2 test
	AA	AG	GG		AA	AG	GG			
Norm	2	38	47	87	2,3	43,7	54,0	0,24		
Barv	1	17	62	80	1,3	21,2	77,5	0,12	0,005	0,006

Tab. 2. Srovnání mezi kontrolami s normálním barvocitem (Norm) a kontrolami s porušeným barvocitem (Barv).

Skupina	Počet osob s daným genotypem			Celkem	Genotypové frekvence v %			Frekvence alely A	Fisher exact test	X2 test
	AA	AG	GG		AA	AG	GG			
Norm	5	68	147	220	2,3	30,9	66,8	0,18		
Barv	0	21	48	69	0	30,4	69,6	0,15	0,587	0,443

Tab. 3. Srovnání alkoholiků s kontrolami – porušený barvocit (Barv), normální barvocit (Norm), srovnání provedeno pomocí Fisher exact testu.

	Alkoholici	Kontroly	Rozdíl
Norm	87	220	
Barv	80 (47,9 %)	69 (23,9 %)	$P < 0,00001$

Z výsledků plyne, že genotyp AG má protektivní účinek na barvocit u alkoholiků. Naopak genotyp GG disponuje osoby závislé na alkoholu k poruše barvocitu.

U kontrolních osob jsme nepozorovali rozdíl v alelických ani genotypových frekvencích mezi osobami s poruchou barvocitu a osobami bez poruchy barvocitu (tab. 2). Z tohoto hlediska je zřejmé, že se genotyp u genu pro BDNF za normálních okolností nepodílí na poruše barvocitu.

Při srovnání osob závislých na alkoholu s osobami z kontrolního souboru bylo zjištěno, že osoby závislé na alkoholu trpí poruchou barvocitu ve 47,9 %, zatímco osoby z kontrolního souboru pouze ve 23,9 % (tab. 3), což odpovídá skupině jedinců s vrozenou poruchou barvocitu, kteří byli zahrnuti do kontrolní skupiny. Zde je třeba zdůraznit, že kontrolní soubor osob nereprezentuje obecnou populaci, protože se jednalo o vybrané jedince.

DISKUSE

Je známo, že alkoholismus může vést k poruše barevného vidění. Kapitany a spol. [5] zjistili v souboru osob závislých na alkoholu 47,2% výskyt poruchy barvocitu. V naší práci jsme zjistili poruchy barvocitu u 47,9 % osob závislých na alkoholu.

V našem souboru osob byl pouze u genu pro BDNF nalezen vztah k poruše barvocitu, a to pouze u skupiny osob závislých na alkoholu.

Nejnovější studie zkoumající možnosti ochrany sítnice před poškozením různými fyzikálními a chemickými vlivy referují o protektivních účincích BDNF. Na kuřecí retině bylo zjištěno, že BDNF se podílí také na vývoji retiny, kdy zvýšená exprese BDNF zvyšuje počet fotoreceptorů v posledních fázích vývoje sítnice, a to až o 25 % [10].

Je známo, že alkohol ovlivňuje CNS prostřednictvím specifických vazebných míst na GABA receptoru. Neurotransmise v sítnici jsou do značné míry zprostředkovány pomocí GABA. Agonisté GABA receptoru mají proapoptotické účinky [3]. Exprese GABA receptorů v sítnici je stimulována světlem, ale také prostřednictvím BDNF. BDNF kontroluje expresi GABA v sítnici [6].

ZÁVĚR

Z uvedeného možno odvodit hypotézu, že excesivní příjem alkoholu způsobuje zvýšenou aktivaci GABA receptorů v sítnici. Exprese GABA receptorů a ochrana fotoreceptorů před apoptózou je ovlivňována prostřednictvím BDNF. U disponovaných osob závislých na alkoholu s genotypem GG genu pro BDNF hrozí vyšší pravděpodobnost vzniku poruchy barvocitu, naopak osoby závislé na alkoholu s genotypem AG mají asi o polovinu niž-

ší pravděpodobnost, že se u nich vyvine porucha barvocitu. Velmi zajímavé výsledky by bylo možné získat poté, co by ze souboru osob závislých na alkoholu, byly vyjmuty osoby s dědičnou formou poruchy barvocitu. Takových osob může být mezi osobami závislými na alkoholu až 11 % [5]. Zůstává otázkou, zda by se tím posílil vliv genotypu genu pro BDNF na výskyt poruchy barvocitu u souboru osob postižených alkoholismem. Výsledky naší studie by měly být ověřeny na větších souborech osob.

Poděkování

Tento projekt byl podpořen Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR – IGA MZ ČR č. NR 8137-3/2004 a č. NR8507-3/2005 a dále projektem Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR č. MSM0021622413.

LITERATURA

1. **Goldberg, T. E., Iudicello, J., Russo, C., Elvegag, B., Straub, R., Egan, M. F., Weinberger, D. R.:** BDNF Val66Met polymorphism significantly affects d' in verbal recognition memory at short and long delays. *Biol. Psychol.*, 77, 2008, pp. 20-24.
2. **Ho, B. C., Andreasen, N. C., Dawson, J. D., Wassink, T. H.:** Association between brain-derived neurotrophic factor Val66Met gene polymorphism and progressive brain volume changes in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 164, 2007, pp. 1890-1899.
3. **Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M. J., Wozniak, D. F., Koch, C., Genz, K., Price, M. T., Stefovská, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J. W.:** Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287, 2000, pp. 1056-1060.
4. **Janak, P. H., Wolf, F. W., Heberlein, U., Pandey, S. C., Logrip, M. L., Ron, D.:** BIG news in alcohol addiction: new findings on growth factor pathways BDNF, insulin, and GDNF. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 30, 2006, pp. 214-221.
5. **Kapitany, T., Dietzel, M., Grünberger, J., Frey, R., Koppensteiner, L., Schleifer, G., Marx, B.:** Color vision deficiencies in the course of acute alcohol withdrawal. *Biol. Psychiatry*, 33, 1993, pp. 415-422.
6. **Lee, E. J., Gibo, T. L., Grzywacz, N. M.:** Dark-rearing-induced reduction of GABA and GAD and prevention of the effect by BDNF in the mouse retina. *Eur. J. Neurosci.*, 24, 2006, pp. 2118-2134.
7. **Selzer, M. L.:** The Michigan alcoholism screening test: the quest for a new diagnostic instrument. *Am. J. Psychiat.*, 127, 1971, pp. 1653-1658.
8. **Šerý, O., Hladilová, R., Novotný, M., Hříbková, H., Znojil, V., Zvolský, P.:** Association between -174 G/C polymorphism of interleukin-6 gene and alcoholism. *Acta Neuropsychiatrica*, 15, 2003, pp. 257-261.
9. **Šerý, O., Mikeš, V., Pítelová, R., Znojil, V., Zvolský, P.:** The association between high-activity COMT allele and alcoholism. *Neuroendocrinology Letters*, 27, 2006, pp. 231-235.
10. **Turner, B. A., Sparrow, J., Cai, B., Monroe, J., Mikawa, T., Hempstead, B. L.:** TrkB/BDNF signaling regulates photoreceptor progenitor cell fate decisions. *Dev. Biol.*, 299, 2006, pp. 455-465.
11. **Velhagen, K.:** Tafeln zur Prüfung des Farbensinnes. 21. edition. Georg Thieme, Leipzig, 1952.

12. **Wilson, R. B., Kunchithapautham, K., Rohrer, B.:** Paradoxical role of BDNF: BDNF+/- retinas are protected against light damage-mediated stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48, 2007, pp. 2877-2886.

Doc. RNDr. Omar Šerý, Ph.D.
Laboratoř neurobiologie
a molekulární psychiatrie
Laboratoře molekulární fyziologie
Ústav biochemie
Přirodovědecká fakulta MU
Kotlářská 2
611 37 Brno
e-mail: omarsery@sci.muni.cz

Ředitel Fakultní nemocnice Hradec Králové vypisuje výběrové řízení na místo

➤ **lékaře** psychiatrické kliniky

Požadujeme:

- magisterské vysokoškolské vzdělání v oboru všeobecné lékařství
- zdravotní způsobilost a bezúhonnost
- *specializovanou způsobilost v oboru dětská a dorostová psychiatrie nebo zařazení do specializační přípravy v tomto oboru*
- zájem o výukovou, publikační a výzkumnou činnost
- znalost anglického jazyka
- znalost práce na PC

➤ **lékaře** psychiatrické kliniky

Požadujeme:

- magisterské vysokoškolské vzdělání v oboru všeobecné lékařství
- zdravotní způsobilost a bezúhonnost
- *specializovanou způsobilost v oboru psychiatrie nebo předpoklad brzkého dosažení této kvalifikace*
- zájem o výukovou, publikační a výzkumnou činnost
- znalost anglického jazyka
- znalost práce na PC

➤ **lékaře** psychiatrické kliniky

Požadujeme:

- magisterské vysokoškolské vzdělání v oboru všeobecné lékařství
- zdravotní způsobilost a bezúhonnost
- *specializovanou způsobilost v oboru psychiatrie nebo zařazení do specializační přípravy v oboru*
- zájem o výukovou, publikační a výzkumnou činnost
- znalost anglického jazyka
- znalost práce na PC

Nabízíme:

- platové ohodnocení podle platných předpisů doplněné osobním příplatkem podle výkonnosti
- práci v nově vybudované Psychiatrické klinice
- možnost akademické kariéry, včetně postgraduálního studia (Ph.D.)

Nástup po vzájemné dohodě.

Případné informace na tel. č. 495 832 228 sekretariát kliniky.

Písemné přihlášky doložené kopiemi dokladů o získané kvalifikaci, životopisem a přehledem o průběhu předchozí praxe zasílejte do dvou týdnů po uveřejnění na odbor personálních vztahů Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové.