

Кондратьева Наталья Сергеевна

**ПОИСК МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ОСНОВ
ПАТОГЕНЕЗА МИГРЕНИ**

03.02.07 – «Генетика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА – 2016

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным ВОЗ мигрень является одной из ведущих причин потери трудоспособности (9 место). По данным эпидемиологических исследований распространенность мигрени в мире за 1 год среди взрослого населения составляет в среднем от 10.2% (Stovner et al., 2007) до 14.7% (Steiner et al., 2013). В России цифры распространенности мигрени превышают мировые показатели почти в 1.5-2 раза – 20.3%, а ежегодные косвенные расходы (потеря дней трудоспособности) по причине первичных головных болей составляют 22.8 млрд долларов США (1.75% от валового внутреннего продукта России) (Ayzenberg et al., 2014). Таким образом, мигрень является не только медицинской, но и значимой экономической проблемой.

До сих пор диагноз «мигрень» является исключительно клиническим, и любые диагностические тесты направлены лишь на исключение других причин головной боли (Осипова, 2010). Несмотря на наличие большого количества специфических противомигренозных препаратов, терапия пациентов с мигренью все еще недостаточно эффективна. Значимой клинической проблемой является хронификация приступов мигрени и развитие хронической ежедневной головной боли, которая возникает у 1% пациентов в год (Katzarava and Limmroth, 2006). При этом около 10% пациентов с мигренью в популяции и 40-60% пациентов, обращающихся в специализированные центры головной боли, являются резистентными к стандартной терапии (Loder, 2009).

Соответственно, поиск биомаркёров мигрени, подтверждающих данный диагноз, а не опровергающих другие, является ведущим вектором в данном научном направлении.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время роль наследственного фактора в развитии мигрени не вызывает сомнения. Родственники пациентов с мигренью страдают от этого заболевания достоверно чаще, чем в общей популяции (Russell and Olesen, 1993). С помощью популяционных исследований семей с мигренью показано повышение в 1.5 раза риска развития заболевания у ближайших родственников (Russell and Olesen, 1995; Stewart et al., 1997). Изучение генов моногенных форм мигрени в популяции пациентов с классической мигренью с аурой и мигренью без ауры не дало результатов. Одним из подходов изучения мигрени является проведение ассоциативных исследований генов-кандидатов, способных повышать риск заболевания или определять особенности его течения. Показана ассоциация с мигренью многих генов, в частности регулирующих активность серотонинергической и дофаминергической систем, уровень женских половых гормонов и т.д.

В настоящее время исследовательские работы по поиску генов-кандидатов предрасположенности к мигрени активно продолжаются. В 2010 году началась новая эра изучения генетики мигрени – закончено первое полногеномное исследование (GWAS), которое выявило мутацию в регуляторной последовательности гена *MTDH* (регулятор транскрипционной

активности гена белка-транспортера глутамата, *EAAT-2*) (Anttila et al., 2010). Тем не менее, данный ген не оказывал значимого влияния на формирование клинической картины самой мигрени (Esserlind et al, 2011).

Изучение потенциальных биохимических маркёров мигрени (белков и малых молекул) – также не показало однозначных результатов. Отмечено изменение уровня некоторых основных медиаторов при мигрени (Loder and Rizzoli, 2006; Durham and Papapetropoulos, 2013). Однако эти изменения по большей части выявлены в период приступа и не могут претендовать на роль инициирующих процесс молекул, т.к. являются скорее последствием приступа, а не его причиной.

Таким образом, современное состояние научных знаний в области молекулярной природы мигрени не дает полного понимания причинно-следственной связи ее патогенеза. Поэтому, представляется, что единственным адекватным подходом для изучения молекулярных механизмов патогенеза мигрени сегодня является анализ имеющейся литературы с использованием современных программных средств и построение схем сигнальных путей межмолекулярных взаимодействий на основе данных литературы с последующей экспериментальной проверкой молекулярно-генетических и биохимических изменений у пациентов с мигренью.

Цель исследования:

построение схем сигнальных путей патогенеза мигрени для выявления потенциальных молекулярно-генетических маркёров предрасположенности и их экспериментальная проверка.

Задачи исследования:

1) Обработать имеющиеся в мировой литературе данные и определить список генов и белков, связанных с мигренью. На основании литературных данных построить схемы гипотетических сигнальных путей межмолекулярных взаимодействий, описывающие формирование приступа мигрени. Исходя из полученной информации, выбрать гены и функциональные полиморфные варианты в них для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

2) Определить частоты генотипов и аллелей SNP в отобранных генах с мигренью в выборке пациентов с мигренью и в контрольной необследованной выборке, провести поиск ассоциаций исследуемых генов с мигренью.

3) Провести поиск ассоциаций комплексных генотипов исследуемых генов с мигренью.

4) Соотнести выявленные ассоциации с изменениями в сигнальных путях, приводящих к формированию мигренозного приступа.

Методология и методы исследования

Для учета клинических характеристик пациентов разработана «Индивидуальная карта пациента с головной болью», которую заполнял лечащий врач, ставивший соответствующий диагноз. В исследование вошли неродственные пациенты с диагнозом мигрень, согласно МКГБ-3.

Молекулярно-генетический анализ: для оценки аллельного состояния генов *ССК* (rs1157184), *ССК1R* (rs1799723, rs1800908, rs1800857), *ССК2R*

(rs1805002, rs1805000), *DBH* (rs1611115, rs2097629), *MTHFR* (rs1801133), *MTR* (rs1805087), *BDNF* (rs2049046, rs6265, rs11030107), *CGRP* (rs1553005) применялся ПЦР-ПДРФ анализ; генов *ACE* (rs4646994) и *DBH* (rs141116007) – ПЦР с последующим разделением в 2% и 3% агарозном геле, соответственно; генов *NOS1* (rs41279104), *NOS3* (rs2070744), *NOS3* (rs2779249), *MTDH* (rs1835740), *SNAP25* (rs11547859) – ПЦР в реальном времени с аллель-специфичными TaqMan-зондами.

Статистическую обработку проводили с помощью критерия Пирсона и программы для поиска полигенных ассоциаций (APSampler v3.6). Для построения генных сетей (signaling pathways) использован программный продукт PathwayStudio (версия 9.0) и реферативная база ResNet11.

Положения, выносимые на защиту

Проведен полный анализ литературы (данные на 1 января 2015 г.), выявлено 147 генов, для которых показана связь с мигренью.

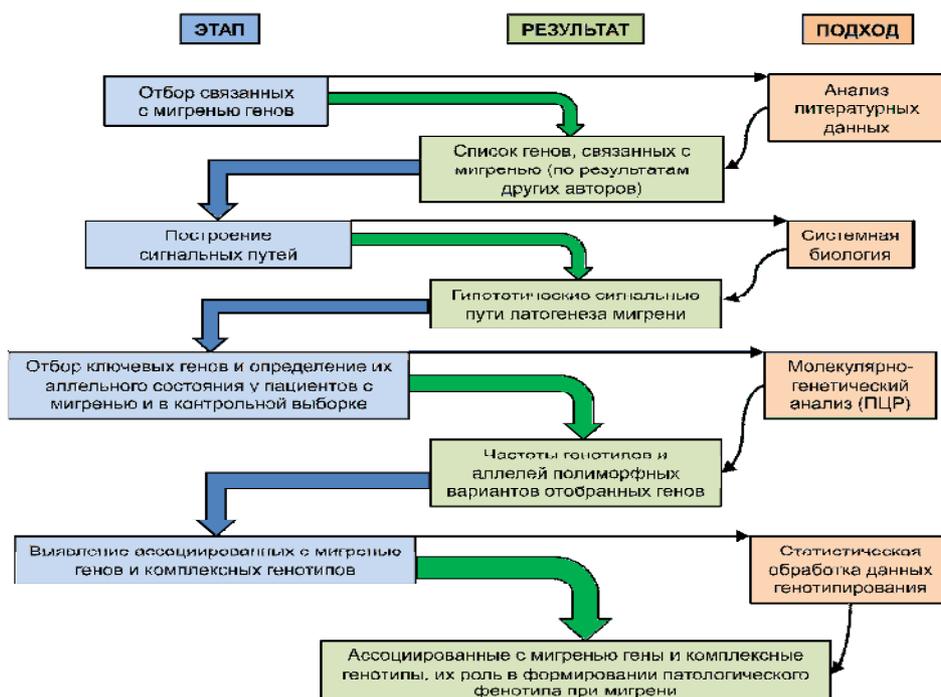
Построены схемы сигнальных путей, описывающие возможные механизмы патогенеза мигрени на основе списка генов, функционально ассоциированных с мигренью.

Определены частоты генотипов и аллелей замен в генах *ACE*, *BDNF*, *CCK*, *CCKAR*, *CCKBR*, *CGRP*, *DBH*, *MTDH*, *MTHFR*, *MTR*, *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *SNAP25* у пациентов, страдающих мигренью и контрольной группы.

Найдены статистически значимые ассоциации с мигренью для полиморфных вариантов генов *CCKAR* (rs1800857 аллель С), *CCKBR* (rs1805000 аллель Т) и *MTHFR* (rs1801133 аллель Т), данные аллели имеют доминантный характер наследования.

Выявлено 7 комплексных генотипов, повышающих риск развития мигрени более чем в 10 раз. Значительный вклад в развитие заболевания вносит аллель *CCKAR*_rs1800857:С, повышающий риск развития мигрени в 21 раз.

Общий план работы представлен в виде схемы:



Степень достоверности и апробация результатов

Работа Кондратьевой Н.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне. Используемые методы соответствуют поставленным задачам. Достоверность полученных в ходе исследования результатов подтверждена биоинформационными и молекулярно-генетическими методами, хорошо охарактеризованной выборкой пациентов. Результаты исследования соответствуют данным, представленным в отечественной и зарубежной литературе. Проведенный статистический анализ подтверждает достоверность полученных результатов. Изложенные в диссертационном исследовании положения и выводы являются достоверными.

Материалы работы докладывались на российских и международных конференциях: 17^{ой}, 18^{ой}, 19^{ой} Международная Пушчинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука XXI века» в 2013, 2014, 2015 гг. (Россия, г.Пушино); VII Московский международный конгресс «Биотехнология: состояния и перспективы развития» в 2013 г. (Россия, г.Москва); IX Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» в 2013 г. (Украина, г.Судак); XXII съезд физиологического общества им. И.П. Павлова в 2013 г. (Россия, г.Волгоград); VI Съезд Вавиловского Общества Генетиков и Селекционеров (ВОГиС) в 2014 г. (Россия, г.Ростов-на-Дону); Европейский конгресс «8th Congress of the European Federation of IASP Chapters (EFIC)» в 2013 г. (Италия, г.Флоренция); Европейский конгресс «Joint Congress of European Neurology» в 2014 г. (Турция, г.Стамбул); Европейский конгресс «4th European Headache and Migraine Trust International Congress: EHMTIC 2014» в 2014 г. (Дания, г.Копенгаген.); VII съезд Российского общества медицинских генетиков в 2015 г. (Россия, г.Санкт-Петербург); Международный конгресс «17th Congress of the International Headache Society (ИНС 2015)» в 2015 г. (Испания, г.Валенсия); II Международная научная конференция «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы» в 2015 г. (Белоруссия, г.Минск).

Личный вклад автора в проведенные исследования

В диссертации представлены результаты исследований, выполненных самим автором. Личный вклад автора состоит в анализе литературных данных, подготовке черновых вариантов схем сигнальных путей, осуществлении экспериментальной части исследования, обработке, анализе, обобщении полученных результатов и формулировке выводов.

Публикации

Результаты диссертационной работы отражены в 29 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых 4 – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ для защиты диссертаций, 9 статей в других изданиях, 16 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа Кондратьевой Н.С. «Поиск молекулярно-генетических основ патогенеза мигрени» представленная к защите по

специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки), и соответствует формуле специальности, охватывающей проблемы изменчивости и наследственности, закономерности процессов хранения, передачи и реализации генетической информации на молекулярном, клеточном, организменном и популяционном уровнях в области «Генетика человека. Медицинская генетика. Наследственные болезни».

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 98 страницах машинописного текста (без учета списка литературы и приложений), содержит 12 таблиц, 15 иллюстраций, 1 диаграмму. Состоит из следующих разделов: оглавление, список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список используемой литературы, приложения. Библиографический указатель включает 350 источников по 2015 год включительно, из них 6 отечественных и 344 – зарубежных авторов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Формирование выборки больных

В исследование включены 146 неродственных пациентов с диагнозом мигрень с аурой или мигрень без ауры, проживающих в Москве и Московской области. Диагноз установлен в соответствии с критериями Международной классификации головной боли III (ICHD III, 2013г). Все пациенты проходили клинические исследования в Лаборатории неврологии и клинической нейрофизиологии НИЦ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и в Университетской клинике головной боли. Для учета клинических характеристик пациентов разработана «Индивидуальная карта пациента с головной болью». Средний возраст пациентов с мигренью 41.6 ± 12.5 лет. В качестве контроля в работе использовали образцы ДНК, выделенной из цельной крови необследованных жителей Москвы (363 человека). Работа одобрена Локальным этическим комитетом ИОГен РАН.

Молекулярно-генетические методы

Для выделения ДНК из цельной крови использовали коммерческий набор ДНК MagnaTM DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория ИзоГен», Москва).

Оценку аллельного состояния генов *CCK* (rs1157184), *CCK1R* (rs1799723, rs1800908, rs1800857), *CCK2R* (rs1805002, rs1805000), *DBH* (rs1611115, rs2097629), *MTHFR* (rs1801133), *MTR* (rs1805087), *BDNF* (rs2049046, rs6265, rs11030107), *CGRP* (rs1553005) осуществляли методом ПЦР-ПДРФ с использованием ферментов Bsc4I, HinfI, PstI, Bst4CI, BstDEI, FauI, BstMAI, HinfI, HaeIII, HinfI, PspCI, TaqI, MnlI. Продукты рестрикции разделяли в 2% агарозном геле.

Аллельное состояние генов *ACE* (rs4646994) и *DBH* (rs141116007) оценивали с помощью ПЦР (набор «HS Taq ДНК полимераз», ЗАО «Евроген», Москва) с последующим разделением продуктов амплификации в 2% и 3% агарозном геле, соответственно.

Для замен в генах *NOS1* (rs41279104), *NOS2* (rs2779249), *NOS3* (rs2070744), *MTDH* (rs1835740), *SNAP25* (rs11547859) аллельное состояние определяли с помощью ПЦР в реальном времени, используя коммерческий набор qPCR mix (ЗАО «Евроген», Москва) и аллельспецифичные TaqMan-зонды, синтезированные в ООО «ДНК-синтез».

Методы статистического анализа

Статистическую обработку проводили с помощью критерия Пирсона и программы для поиска полигенных ассоциаций (APSampler v3.6). Для построения генных сетей (signaling pathways) использован программный продукт PathwayStudio (версия 9.0) и реферативной базой ResNet11.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск в базах данных научной литературы генов, ассоциированных с мигренью

Достоверные биомаркёры мигрени, особенно генетические маркеры, могут позволить прогнозировать предрасположенность к болезни и тяжести ее течения. В ходе работы произведен поиск информации о генетических маркёрах, ассоциированных с мигренью. Исходный список генов составлен с использованием программы PathwayStudio10 ® и реферативной базы данных ResNet11 ® компании Elsevier (США). В результате анализа отобраны все гены, для которых программа нашла связь GeneticChange с мигренью.

Далее детально анализировали статьи из списка. Учитывали оригинальные статьи, со статистически значимыми результатами, а также обзоры, включающие значимую информацию (указание, каким образом ген связан с мигренью, наличие ссылки на статью с оригинальным исследованием). На основе полученных результатов построена таблица, включающая информацию: название гена, возможные причины связи с мигренью, маркёры, метод детекции, параметры выборки, комментарии, MedLine Reference.

В результате анализа найдено 147 генов, связанных с мигренью. Далее эти гены, для удобства, распределены по участию их в выполнении различных процессов (тонус сосудов, метаболизм нейротрансмиттеров, транспорт и рецепция нейротрансмиттеров, мембранный потенциал, нейрогенез, воспаление, другое) и функционировании разных систем (глутаматергическая, серотонинергическая, дофаминергическая, цикл фолатов, половые гормоны, сосуды, ионные каналы, иммунная система, внеклеточный матрикс, болевая чувствительность, другие), задействованных в патогенезе мигрени.

Гипотетические сигнальные пути мигрени

Одна из основных проблем в изучении механизмов патогенеза мигрени – отсутствие моделей данного заболевания у животных (за исключением СГМ). СГМ значительно отличается от классической мигрени по клиническим характеристикам и сопутствующим заболеваниям, а также по типу наследования. Сходством является только несколько симптомов, из которых на

наш взгляд следует обратить внимание на ауру, распространяющуюся корковую депрессию (РКД), вазодилатию и боль.

Гипотетические сигнальные пути патогенеза семейной гемиплегической мигрени

На данном этапе работы мы провели анализ молекулярных и межклеточных процессов при патогенезе 3-х форм семейной гемиплегической мигрени. Особенности СГМ являются большая частота ауры, нейрональная гипервозбудимость и РКД.

Ген *CACNA1A* кодирует основную субъединицу вольтаж-зависимых нейрональных кальциевых каналов (Cav2.1, функция - модуляция выхода глутамата) (Catterall, 1998). Мутации гена *CACNA1A* вызывают развитие СГМ I типа (ФНМ1) и связаны с различными вариантами каналопатий: нарушение проводимости ионного канала, изменение его кинетики или структуры (Cao et al., 2004; Hans et al., 1999; Kraus et al., 2000; Tottene et al., 2002), что приводит к усилению тока ионов кальция через вольтаж-зависимые каналы и выбросу нейромедиаторов.

Ген *ATP1A2* кодирует $\alpha 2$ субъединицу глиальной и нейрональной K^+/Na^+ -АТФазы, и мутации в этом гене приводят к развитию СГМ II типа (ФНМ2, идентифицировано более 50 мутаций) (Maagdenberg et al., 2010). Снижение активности K^+/Na^+ -АТФазы приводит к нарушению обратного захвата клетками глии глутамата из синаптической щели.

Ген *SCN1A*, мутации в котором приводят к развитию СГМ III типа (ФНМ3), кодирует структуру формирующей пору $\alpha 1$ -субъединицы вольтаж-зависимых натриевых каналов (Nav1.1). Этот тип ионных каналов представлен преимущественно в теле и проксимальной части дендритов ингибирующих вставочных нейронов (Yu et al., 2006). Подобное специфическое расположение Nav1.1-каналов играет ключевую роль в развитии гипервозбудимости дендритов, важнейшего компонента синаптической передачи.

Исходя из этих данных, построены схемы гипотетических молекулярных сигнальных путей, описывающие причины и возможные механизмы для развития ауры и РКД, в случае СГМ. Результат представлен на рисунке 1.

В случае СГМ1 происходит повышение внутриклеточного кальция, что приводит к слиянию везикул с мембраной и выбросу глутамата в синаптическую щель. При СГМ2 снижение или потеря активности активация K^+/Na^+ -АТФазы приводит к накоплению калия в межклеточном пространстве, а натрия внутри клетки. Это нарушает работу транспортеров глутамата и увеличивает концентрацию глутамата в синаптической щели. Мутация в гене СГМ3 приводит к изменению транспорта натрия через мембрану, что ведет к увеличению внутриклеточного кальция и выбросу глутамата в синаптическую щель. Таким образом, ключевым моментом в нашей схеме является патологическое увеличение при всех типах СГМ концентрации глутамата в синаптической щели. Дальше при всех типах СГМ молекулярные процессы идут одинаково.

Глутамат активирует NMDA рецепторы на постсинаптических нейронах. Активация NMDA рецепторов приводит к деполяризации мембраны, посредством выброса калия на поверхность клетки из внутриклеточного пространства. Гипер деполяризация является основой для возникновения РКД – распространяющейся деполяризации клеток мозга. Аура, предшествующая мигренозному приступу, является следствием РКД.

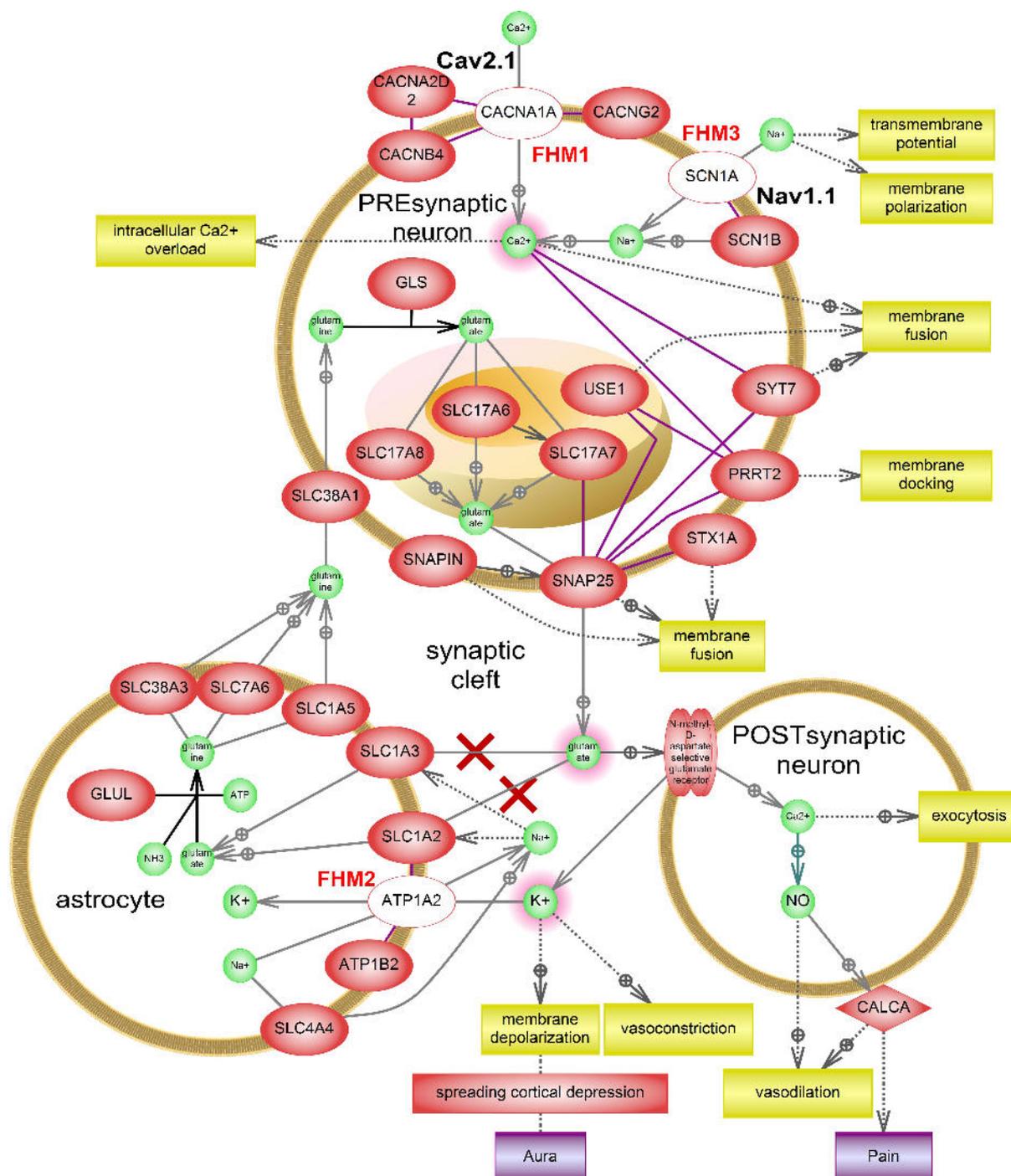


Рисунок 1. Сигнальные пути, ведущие к развитию корковой распространяющейся депрессии => ауре и вазодилляции = боли. Выбелены – белки с потерей функциональности. Подсвечены красным – молекулы и процессы с патологическим увеличением концентрации.

Также выброс калия приводит к вазоконстрикции ближайших сосудов. По данным некоторых авторов вазоконстрикция предшествует боли и вазодилатации и происходит параллельно с РКД (Gunner et al., 2008; Viola et al., 2012). Далее в постсинаптических нейронах происходит индукция синтеза оксида азота (NO), который в свою очередь приводит к выбросу CGRP (CALCA), что соответственно и приводит к развитию вазодилатации и боли.

Слева изображен цикл глутамат-глутамин-глутамат. Синтез глутамата происходит в пресинаптических нейронах (фермент GLS – глутаминаза). Удаление из синаптической щели осуществляют астроциты. В астроцитах происходит перевод глутамата в глутамин с участием АТФ, NH_3 и фермента GLUL (глутамат-аммоний лигаза). Дальше глутамин транспортируется во внеклеточное пространство, а затем захватывается нейронами, где снова переводится в глутамат.

Таким образом, в настоящем исследовании впервые предложена модель сигнальных путей всех форм семейной гемиплегической мигрени. Новизна данной модели заключается в выявлении общей точки пересечения патологических молекулярных процессов – избытка глутамата в синаптической щели, далее реализующего процессы, ведущие к основным симптомам мигрени. Данная модель может быть использована как отправная точка для создания схем сигнальных путей обычной мигрени.

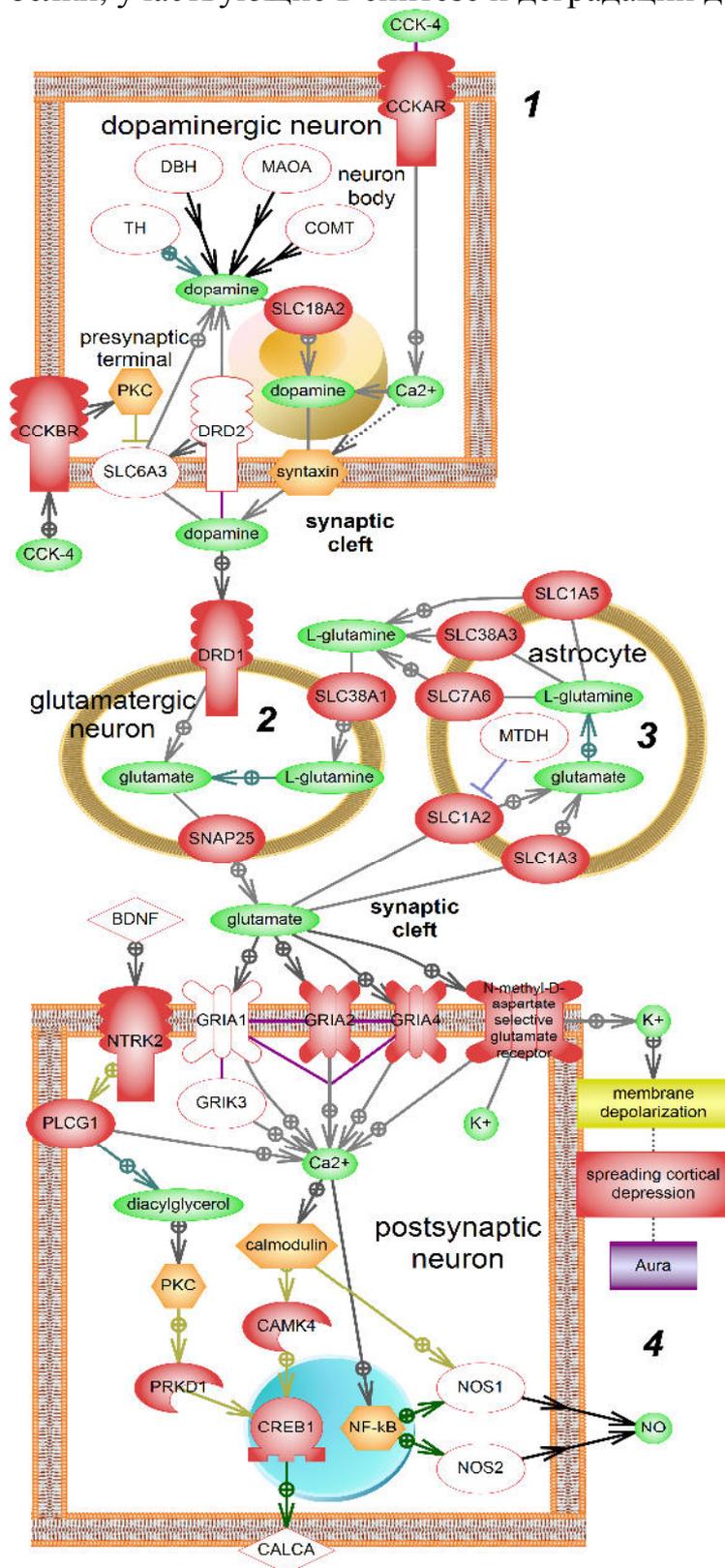
Гипотетические сигнальные пути классической мигрени

При построении схем сигнальных путей классической мигрени мы опирались на имеющиеся у нас схемы сигнальных путей СГМ. Основные теоретические предпосылки: сосудистая теория мигрени, роль распространяющейся корковой депрессии на начальных этапах приступа, участия в патогенезе мигрени глутамата и дофамина. Другой критерий, также определивший стратегию работы, - поместить на схемы сигнальных путей как можно больше молекул из созданного списка.

Всего построено 8 схем сигнальных путей: «Цикл фолатов», «Синтез и циркуляция дофамина», «Эффекты дофамина в постсинаптическом нейроне», «Выброс и циркуляция глутамата», «Эффект глутамата в постсинаптическом нейроне», «Активация эндотелиальной NO-синтазы в клетках эндотелия сосудов», «Процессы, происходящие в клетке гладкой мускулатуры сосуда» и «Активация выброса CGRP (CALCA), приводящая к возникновению боли и расширению сосудов». Первые 7 вошли в автореферат в обобщённом виде в связи с ограниченностью места.

На рисунке 2 представлена обобщённая и сокращённая схема сигнальных путей патогенеза начальных стадий мигрени. На данной схеме отображены следующие процессы. **1.** Активация выброса и обратного захвата дофамина в дофаминергическом нейроне (dopaminergic neuron) посредством активации рецепторов ССК-4. Рецептор ССКAR расположен на теле нейрона (neuron body) и контролирует выброс дофамина, рецептор ССКBR располагается на пресинаптической терминали (presynaptic terminal), контролируя обратный

захват дофамина, опосредованный D2 рецептором дофамина. Также отражены белки, участвующие в синтезе и деградации дофамина.



2. На глутаматергическом нейроне (glutamatergic neuron) находятся D1 рецепторы дофамина, опосредующие выброс глутамата, контролируемый, в том числе, белком SNAP25.

3. Астроциты (astrocyte) изымают избыток глутамата из синапса (synaptic cleft) и переводят его в глутамин, передавая последний нейронам.

4.

Постсинаптический нейрон (postsynaptic neuron) несёт рецепторы глутамата: ионотропные (N-methyl-D-aspartate selective glutamate receptor) и метаботропные (GRIA1, GRIA2 и GRIA4). Их активация приводит к накоплению кальция (Ca²⁺) в клетке и активации множества процессов, в том числе экспрессии CGRP (CALCA) и нейрональной (NOS1 или nNOS) и индуцибельной синтаз азота (NOS2 или iNOS). Также активация ионотропных рецепторов глутамата приводит к выбросу калия (K⁺) из клетки и деполяризации мембраны (membrane depolarization), что является началом РКД (spreading cortical depression) и ауры (Aura).

Рисунок 2. Обобщённая и сокращённая (в связи с ограниченностью места в автореферате) схема сигнальных путей патогенеза мигрени. Выбелены белки, кодируемые ассоциированными с мигренью генами (по данным литературы).

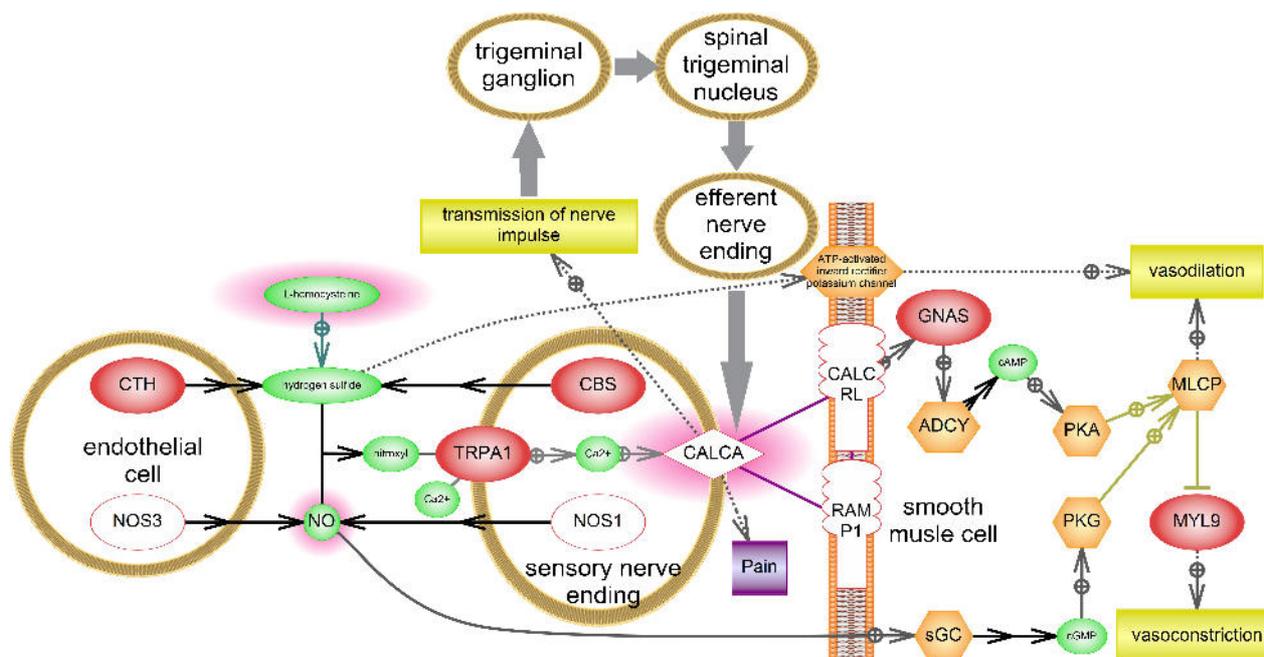


Рисунок 3. Активация выброса CGRP (CALCA), приводящая к возникновению боли и расширению сосудов. Выбелены белки, кодируемые ассоциированными с мигренью генами (по данным литературы).

В работах последних лет (Eberhardt et al., 2014; Dux et al., 2015) выявлены механизмы, способные активировать одновременно два процесса, ассоциированных с мигренью: расширение менингеальных сосудов (вазодилляция) и боль. В клетках эндотелия сосудов и в нервных окончаниях синтезируются оксид азота (NO) и гидроген сульфид (H_2S). Эндогенный H_2S производится преимущественно посредством метаболизма серосодержащих аминокислот: начиная с метионина и его преобразования в гомоцистеин. В организме образование H_2S происходит с участием: цистатионин- γ -лиазы (cystathionine-gamma-lyase, CTH), цистатионин- β -синтазы (cystathionine-beta-synthase, CBS). Белок CTH локализован в основном в эндотелиальных клетках сосудов, а CBS – в нейронах. Оба фермента используют цистеин в качестве основного субстрата при продукции H_2S (Huang et al., 2015). Также H_2S действует на АТФ-чувствительные калиевые каналы (ATP-activated inward rectifier potassium channel) гладкомышечных клеток, что также способствует вазодилляции.

Стоит отметить, что при нарушениях в цикле фолатов имеет место избыток гомоцистеина, а большинство рассмотренных сигнальных путей ведёт к активации эндотелиальной NO-синтазы (NOS3 или nNOS). Оба вещества (NO и H_2S) свободно проникают через мембраны клеток, взаимодействуя они образуют молекулу нитроксил (HNO), которая активирует на окончании тройничного нерва TRPA1 рецептор, это приводит к притоку кальция в клетку. Внутриклеточный кальций активирует экзоцитоз и выброс CGRP (CALCA). Последний активирует вазодилляцию, за счёт релаксации гладкой мускулатуры сосудов, и боль, взаимодействуя с афферентом тройничного нерва. При этом

сигнал возвращается на окончание нерва и повторно активирует приток кальция и выброс CGRP. Соответственно, приводя к образованию единой запущенного цикла, выброс CGRP запускает цикл реакций, приводящих к возникновению самого приступа боли и сопутствующей вазодилатации. Окончание мигренозной атаки является собой затухание этого циклического сигнала и может быть связано с истощением CGRP.

Впервые построенные схемы молекулярных сигнальных путей патогенеза мигрени имеют большое значение для фундаментальных исследований причин развития приступа. Практическое использование полученных схем – выявление новых точек лекарственного воздействия для терапии мигрени.

Поиск ассоциаций генов *ACE*, *BDNF*, *CCK*, *CCKAR*, *CCKBR*, *CGRP*, *DBH*, *MTDH*, *MTHFR*, *MTR*, *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *SNAP25* с мигренью

Для данных генов отобраны ранее изученные в работах других исследователей полиморфные варианты (кроме гена *SNAP25*, однонуклеотидная замена в котором ранее не исследовалась). Исследования ассоциаций генов *CCK*, *CCKAR*, *CCKBR*, *SNAP25* с мигренью не проводилось, для генов *MTR*, *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* имелись единичные работы. Основным критерием отбора SNP в данных генах являлась частота минорного аллеля не менее 10% (исключением является замена в гене *SNAP25* – на момент начала работы это оказалась единственная известная замена в гене, затрагивающая его кодирующую последовательность). Практически все отобранные для анализа SNP несут функциональное значение. Это поможет в дальнейшем оценить их роль в изменении молекулярных сигнальных путей.

Критерии отбора генов и SNP для молекулярно-генетического анализа:

1. Поиск ассоциаций полиморфных вариантов гена *MTHFR* с мигренью проводился многими исследователями на разных выборках, кроме российской. Замена аланина на валин (rs1801133) приводит к уменьшению активности *MTHFR* (Rozen, 1997). Для полной картины был включен ген, кодирующий другой фермент фолатного цикла – *MTR*. Замена аспарагиновой кислоты на глицин (rs1805087) уменьшает активность фермента *MTR*, что приводит к повышению гомоцистеина (Matsuo et al., 2001).
2. Принимая во внимание сосудистую теорию патогенеза мигрени, мы включили в анализ ген *ACE*, продукт которого участвует в регуляции кровяного давления. Полиморфный вариант (289BP ALU)/- (FWD) связан с существенным повышением уровня *ACE* в плазме (Agerholm-Larsen et al., 2000; Staessen et al., 1997) и экспрессии мРНК *ACE* в тканях (Mizuiru et al., 2001; Suehiro et al., 2004) у носителей D аллеля или DD генотипа.
3. Гены *BDNF*, *DBH*, *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* показали перспективностью исходя из построенных схем сигнальных путей. Аллель T (rs41279104, *NOS1*) ассоциирован со снижением экспрессии гена (Saur et al., 2004). Аллель A (rs2779249, *NOS2*) и аллель C (rs2070744, *NOS3*) – с увеличением и снижением транскрипционной активности *NOS2* (Fu et al., 2009) и *NOS3* (Nakayama et al., 1999), соответственно. Замена rs6265 в гене *BDNF* – аллель

Met ассоциирован с аномальной внутриклеточной упаковкой предшественника BDNF и снижением продукции зрелого BDNF в клетках (Chen et al., 2004; Egan et al., 2003). Для замен rs2049046 и rs11030107 в гене *BDNF* функциональное значение не определено. Гомозиготы del/del гена *DBH* (rs141116007) – с низким уровнем активности DBH в плазме (Cubells et al., 2000). Замена С на Т (rs1611115) изменяет транскрипционную активность гена и снижает уровень DBH в плазме. Замена р.Arg535Cys (rs6271) может привести к изменению активности DBH путем образования дисульфидного мостика (Ates et al., 2013).

4. Ген *CGRP* (*CALCA*) отобран для молекулярно-генетического анализа, т.к. в крови пациентов с мигренью выявлен повышенный уровень белка CGRP.
5. Для гена *MTDH* найдена ассоциация с мигренью в ходе GWAS. Аллель Т (rs1835740) ассоциирован с повышенной экспрессией *MTDH* (Anttila et al., 2010)
6. Причина изучения генов *ССК*, *ССКАР*, *ССКВР* – ассоциация данных генов с паническим расстройством, коморбидным мигрени. Концентрация ССК пептидов у носителей генотипов СТ и ТТ (rs11571842, *ССК*) значительно ниже, чем у носителей генотипа СС (Shindo and Yoshioka, 2005). Полиморфные варианты rs1799723 и rs1800908 гена *ССКАР* находятся в области, участвующей в регуляции функции промотора (Takata et al., 2002). Аллель С (rs1800857) может влиять на эффективность сплайсинга первичного транскрипта *ССКАР*, что может привести к изменению уровня белка ССКАР (Ocklenburg et al., 2013). Замена валина на изолейцин (rs1805002) в гене *ССКВР* может повлиять на аффинность рецептора к его лигандам (Kato et al., 1996). Замена р.Leu37Phe (rs1805000) изменяет аминокислотную последовательность рецептора (Okubo and Harada, 2001).
7. Ген *SNAP25* не изучался при мигрени. Его продукт, белок SNAP25, является мишенью для Ботокса, инъекция которого помогает 70% пациентов с мигренью.

Определение частот генотипов и аллелей в выборке пациентов и случайной выборке

Частоты генотипов, полученные в ходе исследования, представлены в таблице 1.

Тест на соответствие равновесию Харди-Вайнберга для выборки больных и контрольной выборки (тест χ^2 при уровне значимости $df=1$) показал отсутствие смещения частот генотипов от нормального распределения во всех случаях, кроме замен ($p < 0,05$):

а) в выборке пациентов rs1800857 (*ССКАР*, $\chi^2=77.03$), rs1805000 (*ССКВР*, $\chi^2=6.29$), rs2049046 и rs11030107 (*BDNF*, $\chi^2=12.93$ и $\chi^2=5.28$), rs2097629 (*DBH*, $\chi^2=6.80$), rs1835740 (*MTDH*, $\chi^2=4.53$), rs2070744 (*NOS3*, $\chi^2=67.39$);

б) в контрольной выборке rs1805002 (*ССКВР*, $\chi^2=15.85$), rs1801133 (*MTHFR*, $\chi^2=6.97$), rs2049046 (*BDNF*, $\chi^2=11,73$), rs1611115 ($\chi^2=7.30$), rs141116007 ($\chi^2=4.38$), rs6271 (*DBH*, $\chi^2=6.41$), rs4646994 (*ACE*, $\chi^2=5.93$), rs2070744 (*NOS3*, $\chi^2=225.86$).

При изучении полиморфного варианта rs11547859 (с.227A>G) в гене *SNAP25* не обнаружено аллеля G в Московской популяции, вследствие чего эта замена далее не исследовалась.

Поиск ассоциаций полиморфных вариантов исследуемых генов с мигренью

Для анализа полученных результатов мы использовали две модели: мультипликативную (частоты аллелей) и общую (частоты генотипов), применяемые в зависимости от исходных условий и допущений. Мультипликативная модель требует условие равновесия Харди-Вайнберга для контрольной выборки, поэтому в анализ не попали замены rs1805002 (*CCKBR*), rs2049046 (*BDNF*), rs1611115, rs141116007, rs6271 (*DBH*), rs2070744 (*NOS3*), rs1801133 (*MTHFR*), rs4646994 (*ACE*). Модель рассчитывается исходя из частот аллелей. Мультипликативная модель наследования для выборки пациентов и контрольной выборки не показала ассоциацию аллелей замен rs1799723, rs1800908 (*CCKAR*), rs1157184 (*CCK*), rs6265 (*BDNF*), rs1553005 (*CGRP*), rs1805087 (*MTR*), rs2779249 (*NOS2*), rs41279104 (*NOS1*). Ассоциация с заболеванием выявлена только для двух SNP: аллеля С rs1800857 (*CCKAR*, $\chi^2=118.26$, $p < 0.05$) и аллеля Т rs1805000 (*CCKBR*, $\chi^2=39.96$, $p < 0.05$).

Общая модель наследования позволяет оценить ассоциацию генотипов с заболеванием и не требует равновесия Харди-Вайнберга, поэтому позволяет исследовать на ассоциации все замены. Результаты поиска ассоциаций, в изучаемых генах с использованием общей модели, описаны в таблице 1.

Таблица 1. Общая модель наследования (тест хи-квадрат, $df=2$). Жирным выделены значения χ^2 и p , где $p < 0.05$.

| Ген | SNP | Генотипы | Частоты генотипов | | χ^2 | p | OR | |
|--------------|------------|----------|-------------------|----------|---------------|----------------|-------|-------------|
| | | | пациенты | контроль | | | знач. | 95% CI |
| <i>CCKAR</i> | rs1799723 | AA | 0,890 | 0,909 | 0,72 | 0,70 | 0,81 | 0.43-1.53 |
| | | AG | 0,103 | 0,088 | | | 1,18 | 0.62-2.26 |
| | | GG | 0,007 | 0,003 | | | 2,5 | 0.16-40.18 |
| | rs1800908 | GG | 0,884 | 0,928 | 2,82 | 0,24 | 0.59 | 0.31-1.11 |
| | | GT | 0,110 | 0,069 | | | 1.66 | 0.86-3.22 |
| | | TT | 0,007 | 0,003 | | | 2.50 | 0.16-40.18 |
| | rs1800857 | CC | 0,124 | 0,749 | 168,16 | 0,00 | 0.05 | 0.03-0.08 |
| | | CT | 0,855 | 0,234 | | | 19.31 | 11.45-32.56 |
| | | TT | 0,021 | 0,017 | | | 1.26 | 0.31-5.10 |
| <i>CCKBR</i> | rs1805002 | AA | 0,841 | 0,834 | 2,19 | 0,33 | 1.05 | 0.62-1.78 |
| | | GA | 0,152 | 0,138 | | | 1.12 | 0.65-1.92 |
| | | GG | 0,007 | 0,028 | | | 0.24 | 0.03-1.93 |
| | rs1805000 | CC | 0,655 | 0,900 | 44,05 | 3,0E-10 | 0.21 | 0.13-0.34 |
| | | CT | 0,345 | 0,100 | | | 4.75 | 2.92-7.72 |
| | | TT | 0,000 | 0,000 | | | 2.48 | 0.05-125.81 |
| <i>CCK</i> | rs11571842 | CC | 0,214 | 0,207 | 0,07 | 0,97 | 1.04 | 0.65-1.67 |
| | | CT | 0,483 | 0,479 | | | 1.01 | 0.69-1.49 |

| | | | | | | | | |
|--------------|-------------|----|-------|-------|--------------|--------------|------|-------------|
| | | TT | 0,303 | 0,314 | | | 0,95 | 0.63-1.44 |
| <i>MTHFR</i> | rs1801133 | CC | 0.386 | 0.570 | 10.44 | 0.005 | 0.48 | 0.30 – 0.75 |
| | | CT | 0.441 | 0.315 | | | 1.72 | 1.08 – 2.73 |
| | | TT | 0.172 | 0.115 | | | 1.60 | 0.84 – 3.05 |
| <i>BDNF</i> | rs2049046 | AA | 0,124 | 0,138 | 1,82 | 0,40 | 0.88 | 0.50-1.57 |
| | | AT | 0,641 | 0,577 | | | 1.31 | 0.88-1.95 |
| | | TT | 0,234 | 0,285 | | | 0.77 | 0.49-1.20 |
| | rs6265 | AA | 0,014 | 0,019 | 4,29 | 0,12 | 0.71 | 0.14-3.44 |
| | | AG | 0,331 | 0,242 | | | 1.55 | 1.02-2.37 |
| | | GG | 0,655 | 0,739 | | | 0.67 | 0.44-1.02 |
| | rs11030107 | AA | 0,667 | 0,758 | 4,18 | 0,12 | 0.64 | 0.33-1.25 |
| | | AG | 0,333 | 0,227 | | | 1.70 | 0.86-3.36 |
| | | GG | 0,000 | 0,015 | | | 0.16 | 0.01-4.10 |
| <i>DBH</i> | rs1611115 | CC | 0,514 | 0,577 | 3,86 | 0,15 | 0.77 | 0.53-1.14 |
| | | CT | 0,418 | 0,329 | | | 1.47 | 0.99-2.18 |
| | | TT | 0,068 | 0,094 | | | 0.71 | 0.34-1.48 |
| | rs141116007 | II | 0,315 | 0,361 | 1,84 | 0,40 | 0.82 | 0.54-1.23 |
| | | ID | 0,500 | 0,434 | | | 1.31 | 0.89-1.92 |
| | | DD | 0,185 | 0,206 | | | 0.88 | 0.54-1.43 |
| | rs2097629 | CC | 0,088 | 0,141 | 3,75 | 0,15 | 0.59 | 0.30-1.16 |
| | | CT | 0,574 | 0,487 | | | 1.42 | 0.94-2.13 |
| | | TT | 0,338 | 0,373 | | | 0.86 | 0.56-1.32 |
| | rs6271 | CC | 0,979 | 0,965 | 0,95 | 0,62 | 1.74 | 0.48–6.27 |
| | | CT | 0,021 | 0,032 | | | 0.63 | 0.17–2.28 |
| | | TT | 0,000 | 0,003 | | | 0.77 | 0.03–19.07 |
| <i>CGRP</i> | rs1553005 | CC | 0,151 | 0,122 | 0,99 | 0,61 | 1.28 | 0.74-2.23 |
| | | CG | 0,459 | 0,453 | | | 1.02 | 0.70-1.51 |
| | | GG | 0,390 | 0,425 | | | 0.87 | 0.58-1.28 |
| <i>MTDH</i> | rs1835740 | CC | 0,788 | 0,833 | 5,37 | 0,07 | 0.74 | 0.46-1.20 |
| | | CT | 0,178 | 0,108 | | | 1.78 | 1.04-3.06 |
| | | TT | 0,034 | 0,058 | | | 0.57 | 0.21-1.55 |
| <i>MTR</i> | rs1805087 | AA | 0,644 | 0,602 | 1,55 | 0,46 | 1.19 | 0.80-1.78 |
| | | AG | 0,322 | 0,339 | | | 0.92 | 0.61-1.40 |
| | | GG | 0,034 | 0,058 | | | 0.57 | 0.21-1.55 |
| <i>ACE</i> | rs4646994 | II | 0,315 | 0,242 | 5,79 | 0,06 | 1.44 | 0.94-2.21 |
| | | ID | 0,459 | 0,431 | | | 1.12 | 0.76-1.66 |
| | | DD | 0,226 | 0,327 | | | 0.60 | 0.38-0.94 |
| <i>NOS2</i> | rs2779249 | CC | 0,452 | 0,493 | 0,33 | 0,56 | 0.85 | 0.58-1.25 |
| | | CA | 0,473 | 0,427 | | | 1.20 | 0.82-1.77 |
| | | AA | 0,075 | 0,080 | | | 0.93 | 0.45-1.93 |
| <i>NOS3</i> | rs2070744 | GG | 0,178 | 0,103 | 5,70 | 0,06 | 1.88 | 1.09-3.24 |

| | | | | | | | | |
|------|------------|----|-------|-------|------|------|------|------------|
| | | GA | 0,815 | 0,894 | | | 0.52 | 0.31-0.90 |
| | | AA | 0,007 | 0,003 | | | 2.39 | 0.15-38.52 |
| NOS1 | rs41279104 | GG | 0,753 | 0,772 | 0,68 | 0,71 | 0.90 | 0.57-1.42 |
| | | GA | 0,247 | 0,225 | | | 1.13 | 0.72-1.77 |
| | | AA | 0,000 | 0,003 | | | 0.78 | 0.03-19.19 |

Анализ частот генотипов показал наличие ассоциации с мигренью для замен: **rs1800857** в гене **CCKAR** ($\chi^2=168.15$, $p < 0.05$), **rs1805000** в гене **CCKBR** ($\chi^2=44.05$, $p < 0.05$) и **rs1801133** в гене **MTHFR** ($\chi^2=10.44$, $p < 0.05$). Также проведены тесты на доминантную и рецессивную модели для установления характера наследования ассоциированных маркёров.

rs1800857, ген CCKAR. Показано значительное преобладание генотипа **CT** в группе пациентов с мигренью, по сравнению с контрольной группой и доминантный характер наследования аллеля **C** (значительное увеличение частоты генотипов **T/C+C/C** в группе пациентов с мигренью, $\chi^2=165.30$, $p < 0.05$).

rs1805000, ген CCKBR. Показано значимое увеличение частоты гетерозигот **CT** в группе пациентов с мигренью; доминантный характер наследования аллеля **T** и протективное действие аллеля **C** (увеличение частоты генотипов **C/T+T/T** в группе пациентов с мигренью, $\chi^2=44.05$, $p < 0.05$).

rs1801133, ген MTHFR. Генотип **CC** имеет протективное действие. Наблюдалось увеличение частоты генотипов **T/T+C/T** в группе пациентов с мигренью ($\chi^2=10.40$, $p < 0.05$). Аллель **T** имеет доминантный характер наследования и участвует в патогенезе мигрени, между тем носительство аллеля **C** имеет протекторный эффект в отношении данного заболевания.

Таким образом, в процессе выполнения работы ассоциации с мигренью генов **ACE, BDNF, CGRP, DBH, MTDH, MTR, NOS1, NOS2, NOS3** не найдено. Показана ассоциация замен **rs1800857** в гене **CCKAR**, **rs1805000** в гене **CCKBR** и **rs1801133** в гене **MTHFR** с мигренью, для каждой из данных замен определен характер наследования. Найденная ранее другими группами исследователей из разных стран ассоциация с мигренью аллеля **T** замены **rs1801133** в гене **MTHFR** подтверждена нами и на выборке из Москвы и Московской области. Ассоциация с мигренью генов **CCKAR** и **CCKBR** показана впервые.

Поиск ассоциаций комплексных генотипов исследуемых генов с мигренью

Поиск полигенных ассоциаций, предсказывающих индивидуальную предрасположенность к многофакторному заболеванию, осуществлялся с помощью программы **APSampler**. Данная программа разработана для поиска составных генетических биомаркеров методом Монте-Карло Марковскими цепями (MCMC). Этот метод не чувствителен к равновесию Харди-Вайнберга, ибо он обладает большей мощностью за счет применения Байесовской статистики.

Проведен полигенный анализ предрасположенности к мигрени у жителей Москвы и Московской области. В анализ взяты данные о генотипах 146

пациентов и 363 контролей по 21 полиморфным участкам 13 генов-кандидатов (SNP в гене *SNAP25* не включен в полигенный анализ).

В результате анализа выявлен 41 комплексный генотип, ассоциированный с мигренью, которые характеризовались уровнем значимости $p_{\text{Westfall-Young}} \leq 0.01$ (на 1000 пермутаций) (Westfall, Young, 1993), с $q\text{-value}$ (Benjamini-Hochberg FDR) $\leq 5 \cdot 10^{-5}$ (Benjamini, Hochberg, 1995), $p_{\text{perm}} \leq 5 \cdot 10^{-5}$. Все выборки прошли поправку на множественное тестирование, полученное скорректированное $p\text{-value}$ с поправкой Бонферрони (Bland, Altman, 1995), которое по всем выявленным паттернам не превышало $p_{\text{Bonf}} \leq 2.3 \cdot 10^{-6}$. Это свидетельствует о высокой достоверности полученных ассоциаций.

Из всех выявленных ассоциаций паттернов аллелей и генотипов отобраны сочетания аллелей, которые повышали риск развития мигрени более чем в 10 раз (таблица 2), т.к. на наш взгляд меньший уровень ассоциации не столь интересен для применения в клинической практике. В ходе исследования протекторных комплексных генотипов ($OR < 1$) не обнаружено.

Таблица 2. Результат анализа ассоциаций сочетаний аллелей, повышающих риск развития мигрени, рассчитан программой APSampler.

| Паттерн информативных аллелей | Больные % | Контроль % | Точный тест Фишера (p-value) | OR | CI(95%) | Пермутационный тест (Westfall-Young), p |
|---|-----------|------------|------------------------------|-------|---------------|---|
| ССКАR_rs1800857:C; ССКBR_rs1805002:G; nNOS_rs41279104:G | 86.9 | 21.7 | 1.28e-42 | 23.93 | 13.85 - 41.34 | <1/100 |
| ССКАR_rs1800857:C; nNOS_rs41279104:G | 87.6 | 22.5 | 1.58e-42 | 24.28 | 13.94 - 42.30 | <1/100 |
| DBH_rs6271:C; ССКАR_rs1800857:C; ССКBR_rs1805002:G | 86.8 | 22.1 | 5.67e-42 | 23.34 | 13.52-40.31 | <1/100 |
| DBH_rs6271:C; ССКАR_rs1800857:C | 87.6 | 22.9 | 6.91e-42 | 23.70 | 13.61-41.27 | <1/100 |
| ССКАR_rs1800857:C; ССКBR_rs1805002:G; eNOS_rs2070744:G | 86.2 | 22.5 | 7.84e-41 | 21.55 | 12.62 - 36.81 | <1/100 |
| DBH_rs1611115:C; ССКАR_rs1800857:C; eNOS_rs2070744:G | 85.5 | 21.8 | 8.71e-41 | 21.13 | 12.47 - 35.82 | <1/100 |
| ССКАR_rs1800857:C; eNOS_rs2070744:G | 86.9 | 23.3 | 9.23e-41 | 21.86 | 12.70 - 37.61 | <1/100 |
| ССКАR_rs1800857:C | 87.6 | 25.1 | 6.96e-40 | 21.09 | 12.20 - 36.47 | <1/100 |

Всего нашим параметрам ($OR > 10$) соответствовало 7 ассоциированных с мигренью комплексных генотипов. Во всех случаях имеет место наличие аллеля ССКАR_rs1800857:C, который самостоятельно повышает риск развития мигрени в 21 раз. Полученные данные полигенного анализа указывают на участие доминантного аллеля ССКАR_rs1800857:C в развитии мигрени, как и

результаты анализа одиночных маркёров (тест χ^2). Минорные маркеры (аллели генов *ССКАR*, *NOS3*, *NOS1* и *DBH*) усиливают действие *ССКАR*_rs1800857:С. Данные о влиянии замен на функцию генов и их продуктов суммированы в таблице 3.

В остальные 36 комплексных генотипов входят аллели генов: *ССКАR*_rs1800857:Т, *MTDH*_rs1835740:С, *ССКАR*_rs1800908:G, *ССКАR*_rs1799723:А, *ССКBR*_rs1805000:Т, *BDNF*_rs6265:G ($OR \leq 6$). Во всех случаях отсутствуют основной аллель предрасположенности *ССКАR*_rs1800857:С. Отдельную группу составляют комплексные генотипы, содержащие аллель *MTHFR*_rs1801133:Т в комплексе с аллелями других генов – *DBH*_INDEL:D, *DBH*_rs2097629:Т, *BDNF*_rs2049046:Т, *ACE*_rs4646994:I ($OR < 4,5$). По всей видимости, наличие этих аллелей снижает негативные эффекты *MTHFR*_rs1801133:Т.

Таблица 3. Эффекты замен, входящих в состав комплексных генотипов.

| Замена | Эффект |
|----------------------------|--------|
| <i>ССКАR</i> _rs1800857:С | ↓ ? |
| <i>ССКBR</i> _rs1805002:G | WT |
| n <i>NOS</i> _rs41279104:G | ↑ |
| <i>DBH</i> _rs6271:С | WT |
| e <i>NOS</i> _rs2070744:G | ↓ |
| <i>DBH</i> _rs1611115:С; | WT |

Примечание: Стрелка вниз – снижению функции белка или активности гена, вверх – увеличение, WT – аллель «дикого типа» (не меняющий активности гена или белка), ? – эффект не доказан (предположение).

Для наглядного отображения эффектов ассоциированных замен из 7 комплексных генотипов построена схема сигнального пути только с участием основных нейротрансмиттеров (определенных ранее с помощью построенных схем сигнальных путей патогенеза мигрени) и продуктов генов, входящих в состав комплексных генотипов (рисунок 4). Также на рисунке представлены болезни и клинические параметры / клеточные процессы, которые имеют место при развитии мигренозной головной боли.

Ассоциированная с заболеванием замена *ССКАR*_rs1800857:С вероятно приводит к снижению эффективности сплайсинга мРНК гена *ССКАR* и, как следствие, к уменьшению количества рецепторов на мембране. Ассоциированные с мигренью аллели генов *ССКBR* (rs1805002:G) и *DBH* (rs6271:С и rs1611115:С) представляют «дикий тип», т.е. не имеют негативного эффекта.

При таком сочетании аллелей генов *ССКАR*, *ССКBR* и *DBH* получается, что эффективно происходит обратный захват и деградация дофамина, но, вероятно, нарушен его выброс. Т.е. имеет место снижение дофамина в синаптической щели и уменьшение функциональности дофаминовой передачи сигнала. Это согласуется с дофаминовой теорией патогенеза мигрени.

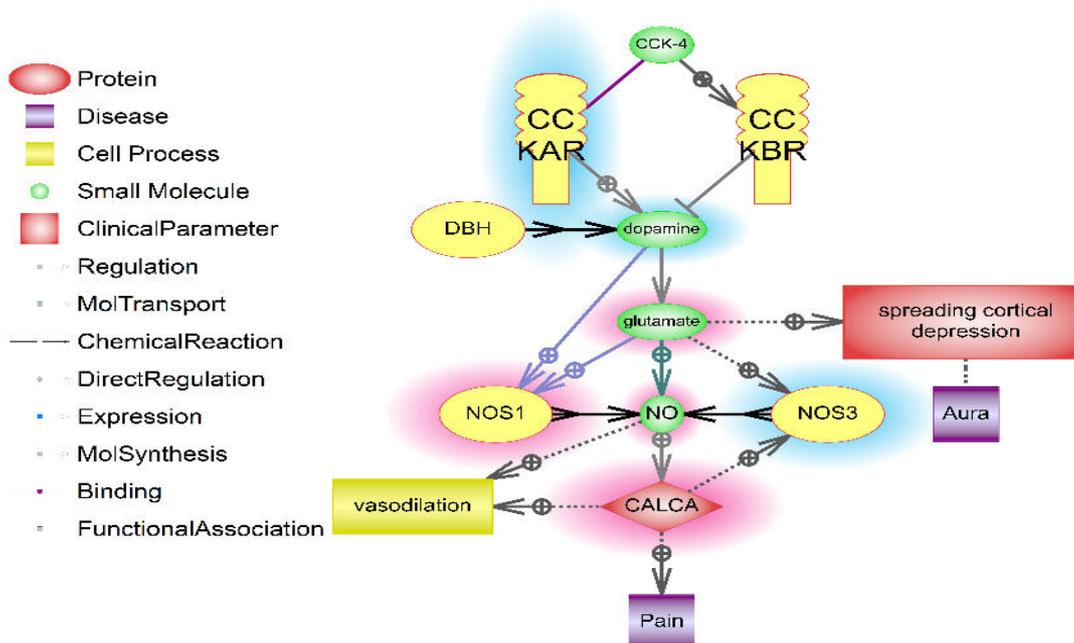


Рисунок 4. Схема патогенеза мигрени с учетом полученных в исследовании данных по ассоциации с заболеванием комплексных генотипов. Описание в тексте.

Между тем снижение уровня дофамина, как и любого другого нейромедиатора, компенсируется увеличением чувствительности его рецепторов – ответ превышает нормальные значения. В таком случае, при возникновении внешнего стимула достаточной силы для выброса большего, чем в обычном состоянии, количества дофамина, происходит более сильная активация сигнальных путей ниже рецепторов дофамина. В частности это приводит к увеличенному выбросу глутамата, который инициирует синтез оксида азота, а также увеличение его содержания способно вызвать РКД и ауру.

Замены в генах NO-синтаз также входят в состав комплексных генотипов. Аллель G нейрональной NO-синтазы (*NOS1*) влияет на транскрипционную активность гена, увеличивая количество белка. Как следствие увеличивается выход оксида азота. Аллель G эндотелиальной NO-синтезы (*NOS3*) напротив снижает эффективность транскрипции гена. В составе комплексных генотипов этот аллель уменьшает OR. Однако влияние *NOS3* на патогенез мигрени имеет место: также показано, что аллель G уменьшает вероятность хронификации мигрени в 2 раза (Kondratieva et al., 2015).

Активация синтеза оксида азота приводит вазодилляции и выбросу CGRP (CALCA), который усиливает вазодилляцию, активирует эндотелиальную NO-синтезу и вызывает боль.

Таким образом, результаты нашей работы доказывают, что в основе патогенеза мигрени может лежать дофаминовая теория патогенеза, как инициирующий фактор. Между тем центральным нейромедиатором, по всей видимости, является глутамат, т.к. его избыток при СГМ не связан с гипофункцией дофамина. А молекулами, ответственными за основные симптомы мигрени – вазодилляция и боль, являются NO и CGRP.

ВЫВОДЫ

- 1) Впервые построены схемы молекулярных сигнальных путей, описывающие возможные механизмы патогенеза мигрени, на основе созданного по литературным данным списка из 147 генов, для которых показана функциональная ассоциация с мигренью. Отобрано 14 генов (22 SNP) для дальнейшего молекулярно-генетического анализа.
- 2) Определены частоты генотипов и аллелей замен в генах *ACE*, *BDNF*, *CCK*, *CCKAR*, *CCKBR*, *CGRP*, *DBH*, *MTDH*, *MTHFR*, *MTR*, *NOS1*, *NOS2*, *NOS3* и *SNAP25* у пациентов (n=146), страдающих мигренью и контрольной группы (n=363). Статистически значимые ассоциации с мигренью выявлены для полиморфных вариантов генов *CCKAR* (rs1800857 аллель С, p=0), *CCKBR* (rs1805000 аллель Т, p=0) и *MTHFR* (rs1801133 генотипы СТ+ТТ, p=0,001). Наибольший вклад в развитие заболевания вносит аллель *CCKAR*_rs1800857:С, повышающий риск развития мигрени в 21 раз.
- 3) Всего найдено 41 комплексный генотип, ассоциированный с мигренью (p<0,03). Охарактеризовано 7 комплексных генотипов (*CCKAR* rs1800857:С + *CCKBR* rs1805002:G + nNOS rs41279104:G; *CCKAR* rs1800857:С + nNOS_rs41279104:G; *DBH* rs6271:С + *CCKAR* rs1800857:С + *CCKBR* rs1805002:G; *DBH* rs6271:С + *CCKAR* rs1800857:С; *CCKAR* rs1800857:С + *CCKBR* rs1805002:G + eNOS rs2070744:G; *DBH* rs1611115:С + *CCKAR* rs1800857:С + eNOS rs2070744:G; *CCKAR* rs1800857:С + eNOS rs2070744:G; *CCKAR*_rs1800857:С), повышающих риск развития мигрени более чем в 20 раз (OD>20, p<0,01).
- 4) Оценена роль аллелей 5 генов, входящих в состав 7 охарактеризованных комплексных генотипов, в изменении молекулярных сигнальных путей, и предположены возможные механизмы, приводящие к формированию мигренозного приступа.

Применение результатов и научных выводов

Впервые построенные схемы молекулярных сигнальных путей патогенеза мигрени вносят существенный вклад в понимание механизмов развития заболевания, что будет способствовать поиску новых биомаркёров мигрени и мишеней для лекарственной терапии.

Полученные данные по ассоциации полиморфных вариантов генов *CCKAR* (rs1800857), *CCKBR* (rs1805000) и *MTHFR* (rs1801133) расширяют представления о формировании патологического процесса и являются основой для создания тест-систем для диагностики предрасположенности и подбора новых мишеней лекарственных средств.

Выявленные ассоциированные с мигренью комплексные генотипы послужат основой для разработки тест-системы для подтверждения диагноза мигрень.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК МОН РФ:

1. Julia E. Azimova, Alexey V. Sergeev, Liubov A. Korobeynikova, **Natalia S. Kondratieva**, Zarema G. Kokaeva, Gadji O. Shaikhaev, Kirill V. Skorobogatykh, Natalia M. Fokina, Gyusal R. Tabeeva, and Eugene A. Klimov. Effects of MTHFR gene polymorphism on the clinical and electrophysiological characteristics of migraine // **ВМС Neurology**. 2013. 13:103. DOI: [10.1186/1471-2377-13-103](https://doi.org/10.1186/1471-2377-13-103)
2. З.Г. Кокаева, Т.О. Кочеткова, Е.В. Афончикова, **Н.С. Кондратьева**, Е.А. Климов. Исследование полиморфизма гена нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) у жителей Москвы // **Генетика**. 2013. Т.49. №12. С.1432–1435. DOI: [10.7868/S0016675813120047](https://doi.org/10.7868/S0016675813120047)
3. Azimova J., **Kondratieva N.**, Sergeev A., Skorobogatykh K., Kochetkova T., Kokaeva Z., Rachin A., Tabeeva G., Klimov E. The role of polymorphism of regulatory region of MTDH gene (rs1835740) in migraine and other forms of primary headaches // **Journal of Neurology & Stroke**. 2015. V.3. №4. 00101. С.1-5. DOI: [10.15406/jnsk.2015.02.00101](https://doi.org/10.15406/jnsk.2015.02.00101)
4. Azimova J., **Kondratieva N.**, Sergeev A., Skorobogatykh K., Kokaeva Z., Rachin A., Tabeeva G., Klimov E. The Role of BDNF Gene Polymorphism in Formation of Clinical Characteristics of Migraine // **Journal of Neurology & Stroke**. 2016. V.4. №2. 00123. DOI: [10.15406/jnsk.2016.04.00123](https://doi.org/10.15406/jnsk.2016.04.00123)

Публикации в других изданиях, тезисы докладов:

5. Климов Е., Рудько О., **Кондратьева Н.**, Кокаева З., Азимова Ю., Сергеев А., Скоробогатых К., Табеева Г. Семейная гемиплегическая мигрень: гипотетические сигнальные пути патогенеза // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. 2013. Т.1. С.269-274. DOI: [10.13140/RG.2.1.1322.6328](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1322.6328)
6. **N. Kondratyeva**, J. Azimova, E. Klimov, A. Sergeev, N. Fokina, Z. Kokaeva, O. Rudko, G. Tabeeva. Association of cholecystokinin receptor 1 gene polymorphism and migraine // *Journal of the Neurological Sciences*. 2013. V.333. Suppl.1. P.e481. DOI: [10.1016/j.jns.2013.07.1707](https://doi.org/10.1016/j.jns.2013.07.1707)
7. J. Azimova, A. Sergeev, N. Fokina, G. Tabeeva, Z. Kokaeva, **N. Kondratyeva**, T. Kochetkova, E. Klimov. The rs1835740 variant on 8q22.1 in episodic and chronic migraine // *European Journal of Neurology*. 2014. V.21. Suppl.1. P.414.
8. Azimova J., Sergeev A., Fokina N., Tabeeva G., Kokaeva Z., **Kondratyeva N.**, Kochetkova T., Klimov E. THE rs1835740 variant on 8q22.1 in episodic and chronic migraine // *Journal of Neurology*. 2014. Vol. 261, Suppl.1. P. S276-S277.
9. A. Sergeev, J. Azimova, E. Klimov, K. Skorobogatykh, Z. Kokaeva, **N. Kondratieva**, T. Kochetkova, G. Tabeeva. Positive association between -1021C/T polymorphism of dopamine-b-hydroxylase gene and level substance dependence in medication-overuse headache // *The Journal of Headache and Pain*. 2014. V.15. Suppl.1. B33.
10. **Кондратьева Н.**, Климов Е., Кокаева З., Азимова Ю., Скоробогатых К., Сергеев А., Табеева Г. Анализ частоты аллелей замены А/Г (rs11547859) в гене SNAP25, являющимся мишенью Ботокса, у пациентов с мигренью и в

- контрольной выборке из московского региона // Международный Научный Институт "Educatio". 2014. №7. С.84-86. DOI: [10.13140/RG.2.1.1224.3285](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1224.3285)
11. Климов Е.А., Рудько О.И., **Кондратьева Н.С.**, Кокаева З.Г., Азимова Ю.Э., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Табеева Г.Р. Гипотетические сигнальные пути патогенеза семейной гемиплегической мигрени I типа // Научный фонд "Биолог". 2015. № 6. С.25-28. DOI: [10.13140/RG.2.1.1471.9447](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1471.9447)
12. **N.S. Kondratieva**, J.E. Azimova, A. Sergeev, K. Skorobogatykh, N.M. Fokina, Z.G. Kokaeva, G.R. Tabeeva, E.A. Klimov. Association of polymorphisms of genes of NO synthases and migraine in Moscow // Cephalalgia. 2015. V.35(6S). P.266. (Abstracts from the 17th Congress of the International Headache Society (IHC 2015)) DOI: [10.13140/RG.2.1.1478.3761](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1478.3761)
13. K. Skorobogatykh, **N. Kondratieva**, J. Azimova, A. Sergeev, N. Fokina, Z. Kokaeva, G. Tabeeva, E. Klimov. Investigation of BDNF and CGRP gene variants in migraine // Cephalalgia. 2015. V.35(6S). P.267. (Abstracts from the 17th Congress of the International Headache Society (IHC 2015)) DOI: [10.13140/RG.2.1.4099.8160](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4099.8160)
14. A. Sergeev, J. Azimova, K. Skorobogatykh, E. Klimov, **N. Kondratieva**, Z. Kokaeva, G. Tabeeva. Association of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene (insertion/deletion) polymorphism (rs4646994) with migraine // Cephalalgia. 2015. V.35(6S). P.268. (Abstracts from the 17th Congress of the International Headache Society (IHC 2015)) DOI: [10.13140/RG.2.1.3149.5447](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3149.5447)
15. **Н.С. Кондратьева**, З.Г. Кокаева, Т.О. Кочеткова, Е.В. Афончикова, Е.А. Климов. Анализ полиморфизма гена BDNF у жителей Москвы // Материалы VII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояния и перспективы развития». Москва, 19-22.03.2013. С.133-134.
16. **Кондратьева Н.С.**, Кочеткова Т.О., Афончикова Е.В., Азимова Ю.Э., Сергеев А.В., Скоробогатых К.В., Кокаева З.Г., Климов Е.А. Поиск ассоциации полиморфизма гена CCK1R с мигренью // Сборник тезисов 17^{ой} Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века". Пушкино, 21-26.04.2013. С.204.
17. Кочеткова Т.О., Азимова Ю.Э., **Кондратьева Н.С.**, Кокаева З.Г., Сергеев А.В., Скоробогатых К.В., Табеева Г.Р., Климов Е.А. Молекулярные механизмы патогенеза мигрени: анализ литературных данных и построение генных сетей // Сборник тезисов 17^{ой} Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века". Пушкино, 21-26.04.2013. С.209.
18. **Кондратьева Н.С.**, Кочеткова Т.О., Кокаева З.Г., Рудько О.И., Азимова Ю.Э., Сергеев А.В., Скоробогатых К.В., Табеева Г.Р., Климов Е.А. Молекулярные механизмы патогенеза мигрени // Сборник тезисов IX Международного Междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Украина, 3-13.06.2013. С.182.
19. Климов Е.А., **Кондратьева Н.С.**, Кочеткова Т.О., Кокаева З.Г., Азимова Ю.Э., Сергеев А.В., Скоробогатых К.В., Табеева Г.Р. Сигнальные пути патогенеза мигрени // Тезисы XXII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. Волгоград. 16-20.09.2013. С.232.

20. A. Sergeev, J. Azimova, E. Klimov, Z. Kokaeva, **N. Kondratieva**, T. Kochetkova, G. Tabeeva. Association between medication overuse headache and 1021C/T polymorphism of the dopamine-beta-hydroxylase gene // Abstract Book of the 8th Congress of the European Federation of IASP Chapters (EFIC). Florence, Italy. 9-12.10.2013. P.531.
21. **Кондратьева Н.С.**, Азимова Ю.Э., Сергеев А.В., Скоробогатых К.В., Табеева Г.Р., Кокаева З.Г., Климов Е.А. Поиск ассоциации генов холецистокининергической и дофаминергической системы с мигренью // Сборник тезисов 18^{ой} Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. Пушкино, 21-25.04.2014. С.256.
22. Климов Е.А., Рудько О.И., Кокаева З.Г., Соболев В.В., **Кондратьева Н.С.**, Афончикова Е.В., Кочеткова Т.О. Ассоциативные исследования в медицинской генетике: будущие перспективы // Тезисы докладов VI Съезда Вавиловского Общества Генетиков и Селекционеров и ассоциированные генетические симпозиумы. Ростов-на-Дону, 15-20.06.2014. С.93.
23. Анучина А.А., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Афончикова Е.В., **Кондратьева Н.С.** Вклад полиморфизма гена DBH-AS1 в патогенез панических расстройств и мигрени // Сборник тезисов 19^{ой} Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. Пушкино, 20-24.04.2015. С.216-217.
24. **Кондратьева Н.С.**, Азимова Ю.Э., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Кокаева З.Г., Табеева Г.Р., Климов Е.А. Анализ полиморфных вариантов генов ACE, BDNF, CCK, CCK1R, CCK2R, CGRP, DBH, MTDH, MTHFR, MTR, NOS1, NOS2, NOS3 с мигренью // Сборник тезисов 19^{ой} Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. Пушкино, 20-24.04.2015. С.240.
25. Анучина А.А., Азимова Ю.Э., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Фокина Н.М., Кокаева З.Г., **Кондратьева Н.С.**, Афончикова Е.В., Табеева Г.Р., Климов Е.А. Полиморфизм гена DBH-AS1 в патогенезе мигрени и панических расстройств // Медицинская генетика. 2015. Т.14. №2. С.9-10. Материалы VII съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург. 19-23.05.2015.
26. Климов Е.А., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Азимова Ю.Э., Соболев В.В., **Кондратьева Н.С.**, Афончикова Е.В., Наумова Е.А., Кокаева З.Г., Рудько О.И. Ген-симптом – новый подход в ассоциативных исследованиях многофакторных заболеваний на примере мигрени // Медицинская генетика. 2015. Т.14. №3. С.13-14. Материалы VII съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург. 19-23.05.2015.
27. **Кондратьева Н.С.**, Азимова Ю.Э., Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Кокаева З.Г., Табеева Г.Р., Климов Е.А. NO-синтазы и мигрень: роль полиморфных вариантов генов в патогенезе заболевания // Медицинская генетика. 2015. Т.14. №3. С.18. Материалы VII съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург. 19-23.05.2015.
28. Наумова Е.А., Афончикова Е.В., Азимова Ю.Э., Фокина Н.М., **Кондратьева Н.С.**, Рудько О.И., Кокаева З.Г., Климов Е.А. Роль полиморфных

вариантов генов холецистокининергической системы мозга в патогенезе панических расстройств // Медицинская генетика. 2015. Т.14. №3. С.51. Материалы VII съезда Российского общества медицинских генетиков. Санкт-Петербург. 19-23.05.2015.

29. Климов Е.А., **Кондратьева Н.С.**, Скоробогатых К.В., Сергеев А.В., Азимова Ю.Э., Анучина А.А., Кокаева З.Г., Рудько О.И. Молекулярно-генетические основы патогенеза мигрени // Материалы II Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». Минск, 13-16.10.2015. С.226.

Список сокращений

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

МКГБ-3 – Международная классификация головных болей 3 (ICHD)

РКД – распространяющаяся корковая депрессия

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

СГМ (ФНМ) – семейная гемиплегическая мигрень (familial hemiplegic migraine)

CI – доверительный интервал (Confidence Interval)

GWAS – genome-wide association study (полногеномное ассоциативное исследование)

OR – отношение шансов (Odds Ratio)

SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм)