

Y International Conference “Actual problems in modern phycology”, 3-5 nov., 2014, Chisineu, Moldova. – Chişineu : CEP USM, 2014. – P. 153–158.

26. Whanger P.D. Selenocompounds in plants and animals and their biological significance // J. Amer. College Nutr. – 2002. – Vol. 21, № 3. – P. 223–232.

27. Zhi-Yong Li, Si-Yuan Guo, Lin Li. Bioeffects of selenite on the growth of *Spirulina platensis* and its bio-transformation // Biores. Technology. – 2003. – Vol. 89. – P. 171–176.

28. Zhou Z., Li P., Liu Z. et al. Study on the accumulation of selenium and its binding to the proteins, polysaccharides and lipids from *Spirulina maxima*, *S. platensis* and *S. subsalsa* // Oceanol. Limnol. Sin. Haiyang Yu Huzhao. – 1997. – Vol. 28, № 4. – P. 363–370.

29. Yamaoka Y., Takimura O., Fuse H. Biosynthesis of glutathione and environmental factors relating to selenium accumulation by algae // First International Marine Biotechnology Conference (IMBC'89). – Tokyo, 1989. – P. 63.

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА DBH-AS1 В ПАТОГЕНЕЗЕ МИГРЕНИ И ПАНИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Анучина А.А.<sup>1</sup>, Кондратьева Н.С.<sup>1</sup>, Афончикова Е.В.<sup>1</sup>, Наумова Е.А.<sup>1</sup>, Кокаева З.Г.<sup>1</sup>, Азимова Ю.Э.<sup>2,3</sup>, Скоробогатых К.В.<sup>3</sup>, Сергеев А.В.<sup>3,4</sup>, Табеева Г.Р.<sup>3,4</sup>, Рудько О.И.<sup>1</sup>, Климов Е.А.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии», Москва, Россия

<sup>3</sup>Университетская клиника головной боли, Москва, Россия

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>5</sup>Университетская диагностическая лаборатория, Москва, Россия

### THE ROLE OF THE POLYMORPHISMS OF DBH-AS1 GENE IN THE PATHOGENESIS OF MIGRAINE AND PANIC DISORDER

Anuchina A.A.<sup>1</sup>, Kondratieva N.S.<sup>1</sup>, Malakhova A.V.<sup>1</sup>, Naumova E.A.<sup>1</sup>, Kokaeva Z.G.<sup>1</sup>, Azimova J.E.<sup>2,3</sup>, Skorobogatikh K.V.<sup>3</sup>, Sergeev A.V.<sup>3,4</sup>, Tabeeva G.R.<sup>3,4</sup>, Rudko O.I.<sup>1</sup>, Klimov E.A.<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Russian Scientific Center of Medical Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

<sup>3</sup>University Headache Clinic, Moscow, Russia

<sup>4</sup>Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

<sup>5</sup>University diagnostic laboratory, Moscow, Russia

**Summary:** Migraines and panic disorder are chronic diseases that are widespread in the population and are often comorbid. The deregulation of the dopaminergic system may be the basis of the pathogenesis of these diseases. A key protein of the biosynthesis of dopamine is the dopamine-beta-hydroxylase encoded by the DBH gene. DBH-AS1 gene is localizing within genomic sequence of DBH gene, on the opposite strand. This gene is encoding antisense RNA 1 of DBH gene and it was not previously investigated in relation to its possible involvement in the pathogenesis of migraine and panic disorder. In this work, the analysis of the two SNP in DBH-AS1 gene - rs2097629 (NR\_102735.1:n.2242T>C) and rs6271 (NR\_102735.1:n.257G>A) - by PCR-RFLP and allele specific real time PCR, respectively, was performed. We used the following samples: 1) 146 patients with migraine (ICBG-III); 2) 124 patients with panic disorder (DSM-V); 3) control - 373 unscreened volunteers residing in Moscow and the Moscow region. The effect on SNPs for the development of panic disorder was not found ( $p>0.5$ ). The possible involvement of the combination of alleles of rs2097629:T and rs6271:G in the pathogenesis of migraine, as well as the protection of patients from the chronification of the disease was observed.

**Key words:** DBH-AS1, SNP, migraine, panic disorder

**Аннотация:** Мигрень и паническое расстройство – хронические заболевания, широко распространенные в популяции и зачастую коморбидные. В патогенез данных заболеваний вовлечена дофаминергической системы. Одним из ключевых белков синтеза дофамина является дофамин-бета-гидроксилаза, кодируемая геном DBH. В пределах геномной последовательности гена DBH, на противоположной цепи, расположен ген, кодирующий DBH антисенс РНК 1 – DBH-AS1, ранее не исследованный в связи с его возможным участием в патогенезе мигрени и панического расстройства. В данной работе проведен анализ двух SNP в гене DBH-AS1 rs2097629 (NR\_102735.1:n.2242T>C) и rs6271 (NR\_102735.1:n.257G>A) методом ПЦР-ПДРФ и методом аллель специфичной ПЦР в реальном времени, соответственно. В работе использованы следующие выборки: 1) 146 пациентов с мигренью (МКГБ-III); 2) 124 пациента с паническим расстройством (DSM-V); 3) контроль - 373 необследованных

жителей Москвы и Московского региона. Влияние замен на развитие панического расстройства отсутствует ( $p > 0,5$ ). Выявлено возможное участие сочетание аллелей rs2097629:T+rs6271:G в патогенезе мигрени, а также защите пациентов от хронификации данного заболевания.

**Ключевые слова:** DBH-AS1, SNP, мигрень, паническое расстройство

### Введение

Мигрень и паническое расстройство (ПР) являются социально значимыми заболеваниями, оказывающими сильное влияние на дееспособность и качество жизни населения.

В России цифры распространенности мигрени превышают мировые показатели (20.3%, в мире – 12-16%), а ежегодные косвенные расходы (потеря дней трудоспособности) по причине первичных головных болей составляют 22.8 млрд долларов США (1,75% от ВВП России) [2].

Финансовые потери по причине тревожных расстройств в мире составляют треть от всех расходов (31%), приходящихся на психические заболевания. Кроме того, на лечение пациентов с тревожными расстройствами уходит в два раза больше средств, чем на лечение больных с соматическими заболеваниями [1].

В случае недостаточного лечения болезни прогрессируют и могут привести к инвалидизации больных, поэтому вопрос изучения механизмов их патогенеза чрезвычайно актуален.

Ко всему прочему, эпидемиологические и клинические исследования свидетельствуют о сопряженности мигрени и тревожных расстройств [13] и, в частности, панического расстройства [9,11]. Доказано, что у пациентов, имеющих мигрень с аурой, паническое расстройство встречается наиболее часто по сравнению с другими психическими нарушениями [9].

Причинами коморбидности мигрени и ПР может служить сходство сигнальных путей, лежащих в основе патогенеза этих заболеваний. В частности, имеются убедительные свидетельства связи дофаминергической системы с патогенезом заболеваний. Получены доказательства гиперчувствительности к дофамину нейронов мозга у пациентов с мигренью [15]. В то же время плазматическая концентрация дофамина и его метаболитов у больных ПР повышена по сравнению со здоровыми людьми [5,10].

Одним из ключевых белков синтеза дофамина является дофамин-бета-гидроксилаза, кодируемая геном *DBH*. Полиморфизм этого гена активно изучается при различных неврологических и психических заболеваниях. В пределах геномной последовательности гена *DBH*, на противоположной цепи, расположен ген, кодирующий *DBH* антисенс РНК 1 (*DBH antisense RNA 1*) – *DBH-AS1*, ранее не исследованный в связи с его возможным участием в патогенезе мигрени и ПР. Этот некодирующий белок транскрипт может регулировать

время жизни мРНК и/или трансляцию *DBH*. Целью данного исследования был анализ ассоциации с мигренью и паническим расстройством двух однонуклеотидных замен rs2097629 (NR\_102735.1:n.2242T>C) и rs6271 (NR\_102735.1:n.257G>A), находящихся в пределах гена *DBH-AS1*.

### Пациенты и Методы

**Пациенты.** Образцы крови больных мигренью и паническим расстройством были собраны в Лаборатории неврологии и клинической нейрофизиологии НИЦ Первого МГМУ им. И.М. Сеченова и в Университетской клинике головной боли.

Отбор пациентов с диагнозом мигрень проводился согласно Международной классификации головной боли III (МКГБ-3 бета, 2013) и в соответствии с критериями Международной классификации болезней (МКБ-10). Общий объем выборки – 146 человек (из них: 76 – с диагнозом «мигрень без ауры» и 16 – с диагнозом «мигрень с аурой», 41 – с диагнозом «хроническая мигрень» и 96 – с диагнозом «эпизодическая мигрень», 125 – женщин и 21 – мужчина), все пациенты проживают в Москве и ближайшем Подмосковье.

Отбор пациентов с диагнозом паническое расстройство проводился согласно Руководству по диагностике и статистике психических расстройств (DSM-V, 2013) и в соответствии с критериями Международной классификации болезней (МКБ-10). Объем выборки составил 124 человека, проживающих в Москве и ближайшем Подмосковье. Основным критерий отбора пациентов – наличие панических атак не реже 1 раза в месяц. По результатам обследования у пациентов не было обнаружено сопутствующих эндокринологических заболеваний, которые довольно часто являются причиной эмоционально-аффективных и поведенческих нарушений, а также вегетативных расстройств.

В качестве контрольных образцов использовалась ДНК, выделенная из цельной крови необследованных жителей Москвы и ближайшего Подмосковья. Объем контрольной выборки составил 373 человека.

Все пациенты подписали информирование согласие на участие в исследовании. Работа одобрена Локальным этическим комитетом ИОГен РАН.

### Молекулярно-генетические методы.

Праймеры для проведения ПЦР были подобраны с использованием программы BeaconDesigner v

8.0. Последовательности праймеров и температура отжига представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика использованных в работе праймеров

Замена	Последовательности праймеров	T <sub>отж.</sub> °C	Размер продукта (п.н.)
rs2097629 (NR_102735.1:n.2242T>C)	F: 5'-GGCTTGGTGTGGTTAGGATGA-3' R: 5'-CCAGGGTCTTGTGCCTCACA-3'	60	<u>229</u>
rs6271 (NR_102735.1:n.257G>A)	<u>CF: 5'-CTGGAACCTCCTTCAACCG-3'</u> <u>TF: 5'-CTGGAACCTCCTTCAACTG-3'</u> <u>R: 5'-TGAGGACTTGTTCAGTG-3'</u>	<u>59</u>	79

Для анализа замены rs2097629 был использован метод ПЦР-ПДРФ. Замена G на A приводит к появлению дополнительного сайта рестрикции для эндонуклеазы BstMAI (СибЭнзим, Россия). Инкубацию

проводили при температуре 55°C. Для детекции результатов проводили электрофорез в 3%-ном агарозном геле (рис. 1). Размеры продуктов: CC=179+50, TT=132+50+47, CT=179+132+50+47.

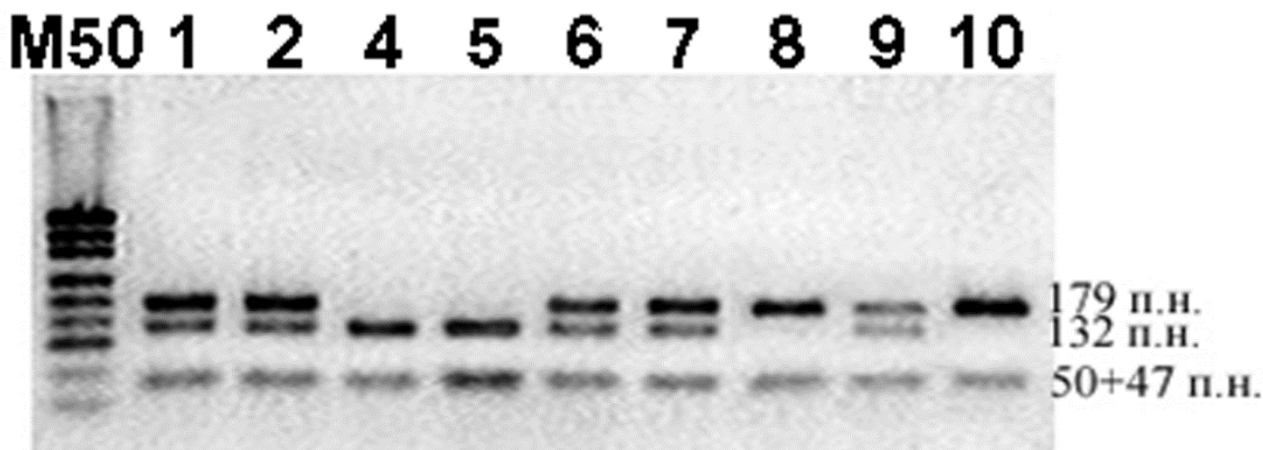


Рисунок. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР-ПДРФ замены rs2097629 в 3%-ом агарозном геле. Фрагмент длиной 229 п.н. подвергался рестрикции с эндонуклеазой BstMAI. 3,4, - гомозиготы по аллелю (TT) 7,9- гомозиготы по аллелю (CC); 1,2,5,6,8 – гетерозиготы (CT).

Для анализа замены rs6271 проводили аллель-специфичную ПЦР в реальном времени с использованием красителя SybrGreen (ДНК-Синтез, Москва) на приборе CFX-96 (Био-Рад, США).

Статистическую обработку данных проводили с помощью метода  $\chi^2$  (значимыми считали различия при  $p < 0,05$ ). Анализ ассоциации комплексных генотипов (сочетания аллелей и генотипов) проводили с использованием программы APSampler 3.0.6 [5].

#### Результаты

В ходе экспериментальной работы были выявлены частоты генотипов и аллелей, представленные в

таблице 2. Полученные частоты генотипов в контрольной выборке и выборках больных были проанализированы на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Смещение частот генотипов от равновесного было выявлено только в случае замены rs6271 ( $p=0,02$ ; контрольная выборка). Для данной замены анализ ассоциации аллелей с заболеваниями не проводился. Проведённый для замены rs2097629 анализ ассоциации аллелей с заболеваниями не выявил значимых отличий ( $p > 0,05$  во всех случаях).

Таблица 2. Частоты аллелей и генотипов проанализированных замен.

Замена	Генотипы	Частоты генотипов			Ал- лели	Частоты аллелей		
		больные мигренью	больные ПР	кон- троль		больные мигренью	больные ПР	кон- троль
rs2097629	CC	0,132	0,113	0,159	C	0,410	0,350	0,398
	CT	0,556	0,476	0,479	T	0,590	0,650	0,602
	TT	0,313	0,411	0,362				
rs6271	GG	0,979	0,943	0,961	G	0,990	0,972	0,979
	GA	0,021	0,057	0,036	A	0,010	0,028	0,021
	AA	0	0	0,003				

Анализ ассоциации частот генотипов с заболеваниями также не выявил ассоциаций:  $p > 0,05$  для мигрени и панического расстройства (таблица 3).

Таблица 3. Общая модель наследования (тест хи-квадрат,  $df = 2$ )

Выборка	Замена	Генотипы	Больные	Контроль (n=373)	$\chi^2$	P	OR	
							знач.	95% CI
Больные мигренью (n=146)	rs2097629	CC	0.132	0.157	2.57	0.28	0.82	0.47 – 1.43
		CT	0.556	0.477			1.37	0.93 – 2.02
		TT	0.313	0.366			0.79	0.52 – 1.19
	rs6271	GG	0.979	0.961	1.23	0.54	1.92	0.53 – 6.91
		GA	0.021	0.035			0.57	0.16 – 2.08
		AA	0.000	0.003			0.70	0.03 – 17.39
Больные ПР (n=124)	rs2097629	CC	0.113	0.157	1.73	0.42	0.68	0.37 – 1.28
		CT	0.476	0.477			1.00	0.66 – 1.50
		TT	0.411	0.366			1.21	0.80 – 1.83
	rs6271	GG	0.944	0.961	1.37	0.5	0.67	0.26 – 1.75
		GA	0.056	0.035			1.63	0.62 – 4.30
		AA	0.000	0.003			0.83	0.03 – 20.48

При анализе комплексных генотипов двух исследованных однонуклеотидных замен ассоциированные сочетания были обнаружены только для мигрени (таблица 4).

Таблица 4. Ассоциированные с мигренью комплексные генотипы гена DBH-AS1.

Сочетания аллелей	Тест Фи- шера, p	OR	CI(95%)	Пермутационный тест (Westfall-Young), p
rs2097629:T; rs6271:G,G	0,022	1,949	1,040-3,652	0,147
rs2097629:C,T; rs6271:G	0,044	1,461	0,969-2,203	0,284

Оба сочетания увеличивают риск развития заболевания. При этом ключевую роль играет аллель G замены rs6271. Однако после прохождения пермутационного теста оба сочетания признаны недостоверными.

Поиск ассоциированных с клиническими характеристиками мигрени сочетаний аллелей проводили с использованием программы APSampler, т.к. используемые в программе алгоритмы позволяют работать с

малыми выборками и не чувствительны к отсутствию равновесия Харди-Вайнберга. Были проанализированы следующие клинические характеристики мигрени: наличие или отсутствие ауры, хронификация мигрени (эпизодическая или хроническая) и пол пациентов. Ассоциированные сочетания аллелей были выявлены только для случаев эпизодической мигрени (таблица 5).

Таблица 5. Ассоциированные с эпизодической мигренью комплексные генотипы гена DBH-AS1.

Сочетания аллелей	Тест Фишера, p	OR	CI(95%)	Пермутационный тест (Westfall-Young), p
rs2097629:T; rs6271:G,G	0,046	1,923	0,937-3,949	0,287
rs2097629:T; rs6271:A	0,042	0,169	0,022-1,304	0,281

Наличие аллеля G замены rs6271 характерно для пациентов с эпизодической мигренью. Полученные данные также не прошли пермутационный тест.

#### Обсуждение

Коморбидность мигрени и ПР является предметом исследований уже довольно долгое время. Частота и выраженность приступов гораздо больше у больных мигренью с коморбидными психическими нарушениями, интерес представляет тот факт, что такие нарушения достоверно чаще встречаются у больных хронической мигренью, чем у больных эпизодической мигренью [7].

Также в недавнем исследовании Kyungmi et al. (2014) было показано, что в корейской популяции у 19% больных мигренью заболевание ассоциировано с тревожностью [11]. A Lee et al. (2008) была доказана ассоциация с ПР для синдрома беспокойных ног в американской популяции (16,7% из болеющих имеют ПР) [8], который довольно часто сопряжен с мигренью [14].

Предыдущие исследования установили, что исследованные нами замены ассоциированы с повышенным риском развития мигрени. В частности, корреляция продемонстрирована для замен rs209762 [16] и rs6271 [5] в случае мигрени с аурой для немецкой и европейской популяций, соответственно. Также доказана связь замен в гене с некоторыми психическими заболеваниями, например, синдромом дефицита внимания и гиперактивности (rs6271) [3].

Полученные нами данные не показывают различий в частотах аллелей и генотипов между выборками больных мигренью и паническим расстройством и контрольной выборкой. Однако выявленные сочетания аллелей свидетельствуют о возможном участии аллеля G замены rs6271 в сочетании с аллелем T замены rs2097629 в патогенезе мигрени. Также сочетание данных аллелей защищает пациентов с мигренью от хронификации данного заболевания (ассоциировано с эпизодической мигренью).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об отсутствии роли исследованных замен в патогенезе панического расстройства и не позволяют с уверенностью говорить об их роли в патогенезе мигрени.

#### Список используемой литературы

1. Сюняков Т.С., Сюнякова С.А., Дорофеева О.А. Механизмы ангиогенеза и терапия тревоги // Психиатрия и психофармакотерапия. – 2011. – Т.13, №6. – С.9–15
2. Ayzenberg I., Katsarova Z., Sborowski A., et al. Headache yesterday in Russia: its prevalence and impact, and their application in estimating the national burden attributable to headache disorders // The Journal of Headache and Pain. – 2015. – Vol. 16. №7. – P. 1-6
3. Carpentier P.J., Arias V.A., Hoogman M., et al. Shared and unique genetic contributions to attention deficit/hyperactivity disorder and substance use disorders: a pilot study of six candidate genes // Eur Neuropharmacol. – Vol. 23. – P. 448-457.
4. Favorov A.V., Andreewski T.V., Sudomoina M.A. et al. A Markov chain Monte Carlo technique for identification of combinations of allelic variants underlying complex diseases in humans // Genetics. – 2005. – Vol. 171. – P. 2113-2121
5. Fernandez F., Colson N., Quinlan S., Macmillan J., Lea R.A., Griffiths L.R. Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus // Neurogenetics. – 2009. – Vol. 10. №3. – P. 199-208
6. Hamner M.B., Diamond B.I. Plasma dopamine and norepinephrine correlations with psychomotor retardation, anxiety, and depression in non-psychotic depressed patients: A pilot study // Psychiatry Res. – 1996. – Vol. 64. №3. – P. 209–211
7. Karakurum B., Soylu Ö., Karatas M., Giray S., Tan M., Arlier Z. Personality, Depression, and Anxiety As Risk Factors for Chronic Migraine // Int. J. Neurosci. – 2004. – Vol. 114. №11. – P. 1391–1399
8. Lee H., Jen J.C., Cha Y.H., Nelson S.F., Baloh R.W. Phenotypic and genetic analysis of a large family with migraine-associated vertigo // Headache. – 2008. – Vol. 48. №10. – P. 1460-1467
9. Marazziti D., Toni C., Pedri S., Bonuccelli U., Pavece N., Nuti A., Muratorio A., Cassano G. B., Akiskal H.S. Headache, panic disorder and depression: comorbidity or a spectrum // Neuropsychobiology. – 1995. – Vol. 31. – P. 125-129
10. Oh J.-Y., Yua B.-H., Heoa J.-Y., Yoo I., Song H., Jeon H. J. Plasma catecholamine levels before and after

paroxetine treatment in patients with panic disorder // Psychiatry Res. – 2015. – Vol. 225. №3. – P. 471–475

11. Oh K., Cho S.-L., Chung Y.K., Kim J.-M., Chu M.K. Combination of anxiety and depression is associated with an increased headache frequency in migraineurs: a population-based study // Neurology. – 2014. – Vol. 14. – P. 1–9

12. Peroutka S. J., Price S. C., Wilhoit T. L., Jones K. W. Comorbid migraine with aura, anxiety, and depression is associated with dopamine D2 receptor (DRD2) NcoI alleles // Mol Med. – 1998. – Vol. 4. №1. – P. 14–21

13. Pesa J., Lage M. J. The Medical Costs of Migraine and Comorbid Anxiety and Depression // Headache. – 2004. – Vol. 44. – P. 562–570

14. Rhode A.M., Hosing V.G., Berger K., et al. Comorbidity of migraine and restless legs syndrome--a case-control study // Cephalalgia. – 2007. – Vol. 27. №11. – P. 1255–1260

15. Sicuteri F. Dopamine, the Second Putative Protonagonist in Headache // Headache. – 1977. – Vol. 17. – P. 129–131

16. Todt U., Netzer C., Toliat M., et al. New genetic evidence for involvement of the dopaminergic system in migraine with aura // Hum Genet. – 2009. – Vol. 125. №3. – P. 265–279.

## К ВОПРОСУ О СОСТОЯНИИ ПОЧВЕННОГО ПОКРОВА КАК ОДНОЙ ИЗ ОСНОВНЫХ ПРОБЛЕМ АГРОЭКОЛОГИИ

**Ханходжаева Нодира Бахтиёровна**

Преподаватель

Ташкентский государственный педагогический университет

**Мадраимова Светлана Маткаримовна**

Преподаватель

Ташкентский государственный педагогический университет

**Закирова Гулнора**

Преподаватель

Ташкентский государственный педагогический университет

*PROTECTION OF ENVIRONMENT AND SAFETY OF OUR ECOLOGY IS CONSIDERED TO BE ONE OF  
THE MOST IMPORTANT PROBLEMS IN MODERN LIFE*

*Hanhodjaeva Nodira Bahtiyarovna*

*Teacher*

*Tashkent state pedagogical university*

*Madraimova Svetlana Matkarimovna*

*Teacher*

*Tashkent state pedagogical university*

*Zakirova Gulnora*

*Teacher*

*Tashkent state pedagogical university*

*Summary: In the article aims and tasks are being discovered as agro- ecology with scientific complex discipline. One of the mainest issue will be put and the anthropologic effect on earth will be covered. The author holds some materials according to the coverings and offers practical ways that are on purpose directed for students and chemists so that they understand the importance of tasks that should be solved in order to protect earth.*

*Key words: chemistry, ecology, agroecology, anthropogenic, soil cover of the Earth, land conservation, environmental issues*

*Аннотация: В статье раскрываются цели и задачи «Агроэкологии» как комплексной научной дисциплины. Ставится одна из основных её проблем – антропогенное влияние на почвенный покров Земли. Автор приводит материалы по мониторингу почвенного покрова и предлагает практические шаги, направленные на осознание студентами-химиками важности стоящих перед ними задач по охране земли.*

*Ключевые слова: химия-экология, агроэкология, антропоген, почвенный покров Земли, охране земли, экологическая проблема*