

Функциональный полиморфизм 5-HTTLPR серотонина — фактор риска развития мигрени с аурой

Костюк С. А.¹, Полуян О. С.¹, Марьенко И. П.², Лихачев С. А.²

*¹Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия
последипломного образования», г. Минск, Республика Беларусь;*

*²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр неврологии
и нейрохирургии», г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. В настоящее время известно, что развитие мигрени тесно связано с продукцией серотонина (5-НТ). Проведенные исследования показали существование связи между генетически опосредованным метаболизмом 5-НТ и патогенезом мигрени. Установлено, что полиморфизм T102C гена 5-HT2A является фактором риска развития мигрени. Функциональный полиморфизм 5-HTTLPR может обуславливать преобладание нарушения равновесия и головокружения у пациентов с мигренью с аурой, а также оказывать влияние на различающийся ответ на препараты агонистов 5-НТ, такие как триптаны.

Ключевые слова: 5-HTTLPR, серотонин, полиморфизм, мигрень, аура, головокружение.

Введение. По данным Всемирной организации здравоохранения, мигрень является одной из ведущих причин потери трудоспособности (9 место), сопоставимой с такими заболеваниями, как онкологическая патология, сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания и др. В женской популяции показатель потери трудоспособности от мигрени занимает 3 место. По данным эпидемиологических исследований, распространенность мигрени в мире за год среди взрослого населения составляет в среднем 10,2–14,7 %. До сих пор диагноз «мигрень» является исключительно клиническим и любые диагностические тесты направлены лишь на исключение других причин головной боли [1, 2]. Важной проблемой является также и то, что мало изучены возможные заболевания, сопровождающие мигрень. Помимо головных болей, во время или между приступами мигрени существует множество различных симптомов, не связанных с головной болью. Головокружение, ассоциированное с мигренью, занимает второе место после доброкачественного позиционного головокружения и значительно превышает частоту головокружения при болезни Меньера. Эти симптомы мигрени влияют на повседневную деятельность пациентов и качество их жизни.

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. С помощью популяционных исследований семей с мигренью показано повышение в 1,5 раза риска развития заболевания у ближайших родственников [3].

Изучение генетики мигрени началось с исследования ее моногенных форм. В настоящее время выделены пять типов семейной гемиплегической мигрени. Молекулярно-генетический анализ пяти генов семейной гемиплегической мигрени позволяет с высокой вероятностью поставить диагноз и прогнозировать тяжесть течения этого заболевания. Однако изучение этих генов в популяции пациентов с классической мигренью с аурой и мигренью без ауры не дало результатов [4, 5].

Известно, что серотонин вовлечен в патофизиологию мигрени и может играть роль в развитии мигренозной головной боли. Подтверждением этой теории является то, что в период приступа мигрени изменяется содержание серотонина в тромбоцитах, а противомигренозные лекарственные средства — триптаны — взаимодействуют с 5-НТ рецепторами [1]. Высказана гипотеза возникновения вестибулярной ауры, обусловленная формированием распространяющейся корковой депрессии (далее — РКД), при которой происходит одновременное вовлечение вестибулярных ядер, мозжечка, тригеминальной системы и таламокортикальных путей. Также предполагается, что при мигрени посредством нейротрансмиттерных нарушений механизм, сходный с РКД и нейрогенным воспалением, может реализовываться не только в пределах мозгового ствола, но и в структурах среднего уха. Именно это, по мнению авторов, объясняет, возникновение центральных и периферических вестибулярных нарушений во время атак мигрени и в межприступном периоде [9, 10]. Экспериментально было показано, что внутривенное введение серотонина вызывает экстравазацию плазмы во внутреннем ухе, в частности в верхушечной части спирального ганглия, стержне улитки и лабиринтной части вестибулярного нерва, что, может, является механизмом дисфункции внутреннего уха при мигрени в виде системного головокружения, а также объясняет феномен гиперчувствительности к звукам при мигрени [8].

Установлено, что активность 5-НТ регулируется посредством функционального полиморфизма в промоторной области гена-транспортера серотонина 5-НТ (5-НТТ *gene-linked promoter region*, 5-НТТLPR) [1]. 5-НТТLPR обеспечивает первичный механизм для обратного захвата 5-НТ после его высвобождения в синаптическую щель и, таким образом, обеспечивает поддержание гомеостаза 5-НТ в мозге. В проведенных ранее исследованиях *in vitro* было установлено, что базовая активность аллеля 5-НТТLPR с инсерцией по 44 паре оснований (длинный вариант, L) приводит к усилению транскрипции 5-НТТ более чем в 2 раза по сравнению с другим аллелем (короткий вариант, S) [6]. Тем не менее, роль генетических полиморфизмов 5-НТ рецепторов в формировании мигрени остается до конца не изученной.

Цель работы — оценка функционального полиморфизма 5-НТТLPR у пациентов с мигренью.

Материалы и методы. В данное исследование было включено 58 пациентов с мигренью и пароксизмами головокружения в анамнезе, находившихся на стационарном лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии». Все пациенты были разделены на 2 подгруппы: подгруппа 1 ($n = 33$) — пациенты с установленным диагнозом «мигрень без ауры», подгруппа 2 ($n = 25$) — пациенты с установленным диагнозом «мигрень с аурой» по критериям Международной классификации головной боли (МКГБ-3 бета, 2013). Аура представлена зрительными нарушениями у 9 пациентов, обонятельными нарушениями у 3 пациентов, нарушение равновесия 13 пациентов. Возраст пациентов подгруппы 1 на момент обследования составил 35 (28; 42) лет, подгруппы 2 — 33 (26; 40) года. В обследуемой группе пациентов преобладали лица женского пола (в подгруппе 1 удельный вес женщин составил $78,79 \pm 7,63 \%$, в подгруппе 2 — $76,00 \pm 8,00 \%$). Контрольную группу составили 19 практически здоровых лиц, сопоставимых по возрасту (37 (30; 44) лет) и полу (удельный вес женщин составил $78,95 \pm 8,19 \%$).

Всем пациентам основной и контрольной групп проводили неврологическое обследование с учетом семейного анамнеза, наличие жалоб на головокружение оценивали с помощью «Дневника сопутствующих симптомов головной боли», тип головокружения оценивали на основе данных «Экспресс-опросника типа головокружения».

В качестве биологического материала для исследования использовали периферическую венозную кровь.

Выделение геномной ДНК из образцов биологического материала проводили с использованием TRIzol-реагента (*Invitrogen*, США) с последующей спектрофотометрической оценкой качества и количества выделенной нуклеиновой кислоты (*NanoDrop 1000*, *Thermoscientific*, США) на длинах волн 260 и 280 нм.

Проверка распределения частот генотипов в выборке проводилась согласно равновесию Харди — Вайнберга (*Hardy — Weinbergequilibrium*). Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета прикладных программ SPSS-версия 16 (*SPSS Inc.*). Все количественные данные имели непараметрическое распределение и представлены в виде значений медиан (Me) с указанием 25 и 75 перцентилей: Me(25;75). Для относительных показателей определяли 95 % доверительный интервал (ДИ). Для решения задачи сравнения двух независимых групп качественных переменных применялся критерий хи-квадрат (χ^2 -тест); количественных переменных — критерий Манна — Уитни (*U*-тест). Расчет относительного риска (ОР) проводили с использованием онлайн-калькулятора (режим доступа : medstatistic.ru). Критическим принят уровень значимости $p < 0,05$ [7].

Результаты и их обсуждение. На основании проведенных исследований установлено, что подгруппы 1 и 2 пациентов с мигренью не имели статистически значимых различий в гендерных характеристиках и семейном анамнезе ($p > 0,05$). При этом в подгруппе 1 обследуемых пациентов по сравнению с контрольной группой из симптомов, сопутствующих головной боли, установлен достоверно высокий удельный вес таких симптомов, как напряжение мышц шеи в 8 (24,24 %) случаях, нарушение равновесия в 4 (12,12 %) случаях, сонливость в 12 (36,36 %), нарушение сна в 16 (48,48 %) случаях ($p < 0,05$).

Таблица 1 — Клинические характеристики пациентов с мигренью 1-й и 2-й подгрупп и контрольной группы

Исследуемый признак, абс., %	Подгруппа 1 (мигрень без ауры), $n = 33$	Подгруппа 2 (мигрень с аурой), $n = 25$	Контрольная группа, $n = 19$
Возраст, лет (Me(25; 75))	35 (28;42)	33 (26;40)	37 (30; 44)
Напряжение мышц шеи	8 (24,24) ¹	12 (48,0) ^{1,2}	4 (21,05)
Нарушение равновесия	4 (12,12)	10 (25,6) ²	5 (26,32)
Сонливость	12(36,36)	11(44,0)	5 (26,32)
Нарушение сна	16 (48,48) ¹	8 (32,0)	5(26,32)
Фотофобия	6 (18,18)	14 (55,0) ^{1,2}	2 (10,52)
Аудиофобия	3 (9,09) ¹	9 (18,55) ^{1,2}	0
Головокружение	9 (27,27)	16 (64) ^{1,2}	4 (21,05)

¹ Различия достоверны по сравнению с контрольной группой.

² Различия достоверны между подгруппами.

В подгруппе 2 обследуемых пациентов по сравнению с контрольной группой из симптомов, сопутствующих головной боли, установлен достоверно высокий удельный вес таких симптомов, как напряжение мышц шеи в 12 (48 %) ($\chi^2 = 3,55$, $p = 0,05$), фотофобия в 14 (56%) ($\chi^2 = 7,41$, $p = 0,006$), аудиофобия в 8 (32 %) ($\chi^2 = 4,74$, $p = 0,03$), головокружение в 16 (64 %) ($\chi^2 = 7,29$, $p = 0,007$), нарушение равновесия в 10 (25,6 %) случаев ($\chi^2 = 4,61$, $p = 0,03$). Анализ жалоб на головокружение по данным экспресс-опросника позволил выявить преобладание позиционно зависимого системного головокружения в подгруппе 2—16 (64 %) из 25 и 5 (55 %) из 9 в подгруппе 1 после приступа головной боли, непереносимость оптокинеза и укачивание составило до 60 % случаев в обеих подгруппах пациентов с мигренью.

Выделение ДНК из биологического материала проводили с использованием набора реагентов АртДНКMiniSpin (АртБиоТех, Беларусь):

— В каждую пробирку вносили по 400 мкл сорбирующего раствора и по 12 мкл лизирующего раствора.

— В каждую пробирку с сорбирующим и с лизирующим раствором вносили по 100 мкл образца. При необходимости в пробирку, промаркированную ОКЭ (отрицательный контроль экстракции), вносили 100 мкл элюирующего раствора; в пробирку ПКЭ (положительный контроль экстракции) вносили 100 мкл положительного контрольного образца (ПКО).

— Пробы перемешивали на вортексе и помещали в термостат, предварительно разогретый до 65 °С, на 1 ч.

— Супернатант вносили в *MiniSpin* колонку. Центрифугировали при 10000 g в течение 30 с. «Проскок» удаляли.

— В колонку вносили 300 мкл сорбирующего раствора. Центрифугировали при 10000 g в течение 30 с. «Проскок» удаляли.

— В колонку вносили 500 мкл промывочного раствора. Центрифугировали при 10000 g в течение 30 с. «Проскок» удаляли.

— Повторяли промывку.

— Центрифугировали при максимальных скоростях (но не более 16000 g) в течение 3 мин с закрытой крышкой.

— Колонку переносили в чистую пробирку объемом 1,5 или 2 мл. На поверхность мембраны аккуратно наносили 15–100 мкл элюирующего раствора, инкубировали 1–3 мин. Для наибольшего выхода ДНК предварительно подогревали элюирующий раствор до температуры 60–65 °С.

— Центрифугировали при максимальных скоростях (но не более 16000 g) в течение 1 мин. Удаляли колонку.

– «Проскок» содержал очищенную ДНК.

Препарат ДНК можно хранить при температуре не выше 4 °С в течение суток, при температуре не выше –16 °С в течение 3 месяцев, при температуре не выше –68 °С в течение года.

Объем первичного биологического материала составил 10 мл.

Степень чистоты выделенной ДНК по соотношению показателей оптической плотности 260/280 составила Me (min...max) 1,96 (1,78...2,03), по соотношению 260/230 — 1,77 (1,62...1,85). Значения концентраций выделенной ДНК составили Me (min...max) 102,65 (20,84...198,69) мкг/мл.

Для выявления повторов в GC-обогащенных регионах, состоящих из 20–23 пар оснований, гена 5-НТТР были использованы следующие праймеры: прямой 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3' и обратный 5'-GAGGGGACTGAGCTGGACAACC-3'.

Дизайн олигонуклеотидов осуществляли последовательно для каждого выбранного гомологичного участка с использованием бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (Режим доступа : <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3>) и бесплатного онлайн-алгоритма mfold/DNAfold (Режим доступа : <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/dna-folding-form>). Для анализа вероятности образования вторичных шпильчатых структур и димеров олигонуклеотидов использовали бесплатное онлайн-обеспечение OligoAnalyzer 3.1 (Режим доступа : <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) и демонстрационную версию коммерческого программного пакета *Vector NTI Advance* 11.0 (Режим доступа : <http://www.thermofisher.com/by/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software/vector-nti-advance-software.html>).

Перед началом анализа последовательностей олигонуклеотидных праймеров провели анализ последовательности предполагаемого ампликона для оценки вероятности образования вторичных шпильчатых структур ампликона, а также вероятности стерических препятствий для связывания олигонуклеотидных праймеров. В результате анализа установлено, что во время протекания ПЦР в режиме реального времени на стадии отжига/элонгации при +60 °С все вероятные вторичные шпильчатые структуры были нестабильны в силу отсутствия отрицательных значений изменения свободной энергии Гиббса. Энергетика возможных шпильчатых структур (G , kcal/mol) составила 0,84; 0,90; 1,55; 1,77. Дальнейший анализ с использованием встроенного алгоритма *Vector NTI — Thermodynamicalproperties* показал наличие 23 вероятных вторичных шпильчатых структур, однако в модельных условиях все они характеризовались низкой стабильностью и как следствие низкой вероятностью образования. Анализ вероятности образования стабильных гомодимеров ампликона показал наличие 1 стабильной структуры ($\Delta G = -4,2$ kcal/mol) из 60 возможных. Результат анализа в режиме *Vector NTI — Oligo Duplexes* показал наличие стабильного гетеродимера обратного олигонуклеотидного праймера. Несмотря на слабоотрицательные значения ΔG димеров, до 70 % всех молекул рассматриваемых олигонуклеотидов с высокой вероятностью будут находиться в димеризованном состоянии и не будут участвовать в реакции.

Состав реакционной смеси для постановки реакции амплификации был подобран следующий: 50 нмоль геномной ДНК, по 0,17 ммоль/л dATP, dCTP, dGTP каждого, 0,083 ммоль/л dGTP; 1,5 ммоль/л MgCl₂, по 0,1 мкг каждого праймера, 1 Ед Taq-полимеразы. Конечный объем реакционной смеси составил 50 мкл.

Программа амплификации была следующая: денатурация при 95 °С в течение 3 мин; собственно амплификация 35 циклов — 95 °С 45 с, 66 °С 60 с, 72 °С 60 с; элонгация 72 °С 7 мин.

Детекция результатов генотипирования осуществлялась методом горизонтального гель-электрофореза в 2,5 % агарозном геле, при этом выявление фрагмента размером 484 пары оснований соответствовало короткому аллелю (S), 528 пар оснований — длинному аллелю (L). Сравнительный анализ полученных результатов осуществляли с использованием маркера молекулярных масс.

Распределение генотипов 5-НТТР статистически достоверно ($p < 0,001$) различалось в основной и контрольной группах, а также между подгруппами основной группы (таблица 2).

Таблица 2 — Полиморфизм гена 5-НТТР в биологическом материале пациентов основной и контрольной групп

Частота выявления геноварианта	Подгруппа 1 (мигрень без ауры), $n = 33$	Подгруппа 2 (мигрень с аурой), $n = 25$	Контрольная группа, $n = 19$
S/S, %	20,00	33,33 ^{1,2}	15,79
S/L, %	36,00 ¹	45,46	52,63
L/L, %	44,00 ^{1,2}	21,21	31,58

¹ Различия достоверны по сравнению с контрольной группой.

² Различия достоверны между подгруппами.

Установлено, что генотип *S/S* гена 5-НТТРР ассоциирован с развитием мигрени с аурой, частота выявления статистически достоверно выше в подгруппе 2 по сравнению с подгруппой 1 и контрольной группой (критерий χ^2 , $p = 0,011$ и $p = 0,008$ соответственно).

Характерной генетической особенностью мигрени без ауры является выявление генотипа *L/L* гена 5-НТТРР, при этом частота его выявления статистически достоверно выше в подгруппе 1 по сравнению с подгруппой 2 и контрольной группой (критерий χ^2 , $p = 0,025$ и $p = 0,041$ соответственно).

Относительный риск возникновения мигрени с аурой, рассчитываемый с использованием онлайн калькулятора, при наличии генотипа *S/S* гена 5-НТТРР составляет 2,80 (95 % ДИ 1,75–3,85) по сравнению с контрольной группой практически здоровых лиц, и 2,31 (95 % ДИ 1,42–3,21) по сравнению с подгруппой пациентов с мигренью без ауры.

Относительный риск развития мигрени без ауры при наличии генотипа *L/L* гена 5-НТТРР составляет 3,44 (95 % ДИ 2,03–4,85) по сравнению с контрольной группой практически здоровых лиц, и 4,05 (95 % ДИ 2,65–5,45) по сравнению с подгруппой пациентов с мигренью с аурой.

Заключение. Проведенное исследование выявило в подгруппе пациентов с мигренью с аурой статистически достоверное преобладание жалоб на головокружение 64 % ($\chi^2 = 7,29$, $p = 0,007$) и нарушение равновесия в 25,6 % случаев ($\chi^2 = 4,61$, $p = 0,03$) по сравнению с контрольной группой и подгруппой пациентов с мигренью без ауры. В большинстве случаев у пациентов с мигренью обеих подгрупп головокружение носило позиционно зависимый характер (60 %), наблюдались укачивание в транспорте и плохая переносимость оптокинетической стимуляции в повседневной жизни.

Исследование функционального полиморфизма 5-НТТЛРР у пациентов с мигренью позволило установить, что в основе формирования мигрени без ауры и мигрени с аурой лежат различные генетически опосредованные факторы. Данный полиморфизм транскрипции 5-НТ может обуславливать преобладание нарушения равновесия и головокружения у пациентов с мигренью с аурой, а также оказывать влияние на различающийся ответ на препараты агонистов 5-НТ, такие как триптаны.

Проведение дальнейших исследований по изучению роли полиморфизма 5-НТТЛРР в развитии мигрени будет способствовать уточнению патогенеза как мигрени, так и головокружения, ассоциированного с мигренью (изучение взаимоотношения генотип-фенотип), разработке прогностических критериев трансформации эпизодической мигрени в хроническую, развития осложнений и индивидуализации терапии.

Литература

1. Steiner, T. J. Migraine: the seventh disabler / T. J. Steiner, L. J. Stovner, G. L. Birbeck // J. Headache Pain. — 2013. — Vol. 14. — P. 1.
2. World Health Organization, Lifting the Burden (2011). Atlas of headache disorders and resources in the world 2011. — WHO, Geneva.
3. Time to act on headache disorders / T. J. Steiner [et al.] // J. Headache Pain. — 2011. — Vol. 12. — P. 501–503.
4. Definitions of medication-overuse headache in population-based studies and their implications on prevalence estimates: A systematic review / M. L. Westergaard [et al.] // Cephalalgia. — 2014. — Vol. 34. — P. 409–425.
5. Steiner, T. J. Can we know the prevalence of MOH? / T. J. Steiner // Cephalalgia. — 2014. — Vol. 34. — P. 403–404.
6. The global burden of headache in children and adolescents — developing a questionnaire and methodology for a global study / C. Wüßler-Bingöl [et al.] // J. Headache Pain. — 2014. — Vol. 15. — P. 86.
7. Наследов, А. Д. SPSS 15 : профессиональный статистический анализ данных. — СПб. : Питер, 2008. — 416 с.
8. Koo, J. W., Balaban C. D. Serotonin-induced plasma extravasation in the murine inner ear: possible mechanism of migraine-associated inner ear dysfunction // Cephalalgia. — 2006. — Vol. 26. — P. 1310–1319.
9. Furman, J. M., Marcus, D. A., Balaban, C. D. Migrainous vertigo: Development of a pathogenetic model and structured diagnostic interview // Curr. Opin. Neurol. — 2003. — Vol. 16. — P. 5–13.
10. Phillips, J. S., Prinsley, P. R. A unified hypothesis for vestibular dysfunction? // Otolaryngol. Head Neck Surg. — 2009. — VUdagatti V. D., Dinesh Kumar R. Migraine Related Vertigo // Indian J Otolaryngol Head Neck Surg. — 2017. — Vol. 69, no 4. — P. 563–567.

Functional 5-HTTLPR polymorphism of serotonin as a risk factor of migraine with aura

Kostiuk S. A.¹, Poluyan O. S.¹, Maryenko I. P.², Likhachev S. A.²

*¹State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”,
Minsk, Republic of Belarus;*

*²State Institution “Republican Scientific and Practical Center of Neurology and Neurosurgery”,
Minsk, Republic of Belarus*

Nowadays it is now known that the development of migraine is closely related to the production of serotonin (5-HT). Studies have shown a link between genetically mediated 5-HT metabolism and migraine pathogenesis. T102c polymorphism of the 5-HT2A gene was found to be a risk factor for migraine. Functional polymorphism of 5-HTTLPR may cause predominance of imbalance and dizziness in patients with migraine with aura, as well as influence differing response to 5-HT agonist drugs such as tryptans.

Keywords: 5-HTTLPR, serotonin, polymorphism, migraine, aura, dizziness.

Поступила 24.09.2019