

На правах рукописи

Коробейникова Любовь Александровна

**АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ
ССК, ССК1R, ССК2R И MTHFR С СОЦИАЛЬНО
ЗНАЧИМЫМИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
ЧЕЛОВЕКА (ПАНИЧЕСКОЕ РАССТРОЙСТВО, МИГРЕНЬ)**

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории сравнительной генетики животных
Учреждения Российской Академии наук
Института общей генетики им Н.И.Вавилова РАН, г. Москва

Научный руководитель:
доктор биологических наук
доцент

Климов Евгений Александрович
Учреждение Российской Академии наук
Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Официальные оппоненты:
доктор медицинских наук

Ганковская Оксана Анатольевна
Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова
РАМН, г. Москва

кандидат биологических наук

Соболев Владимир Васильевич
Учреждение Российской Академии наук
Институт общей генетики
им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

Ведущее учреждение:

Медико-генетический научный центр
РАМН, г. Москва

Защита состоится «__» _____ 2011 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 при Учреждении Российской академии наук Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д. 3.
Тел.: (499) 135-62-13
Факс: (495) 132-89-62
электронная почта: iogen@vigg.ru, aspirantura@vigg.ru
адрес в Интернете: www.vigg.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской Академии наук Института общей генетики им Н.И.Вавилова РАН.

Автореферат разослан «__» _____ 2011г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Синельщикова Татьяна Аркадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Согласно данным Министерства Здравоохранения, эпидемиологическая ситуация в России приобретает все более напряженный характер. Экономическая и социальная нестабильность в обществе влечет за собой неумолимый рост числа заболеваний, получивших название социально значимых. Наряду с такими тяжелыми социально значимыми заболеваниями как туберкулез, гепатит В и С, сахарный диабет, ВИЧ-инфекция, онкологические и сердечнососудистые заболевания, все большее распространение получают неврологические и психические расстройства. Среди относящихся к этой группе заболеваний, характеризующихся высоким уровнем социальной дезадаптации и оказывающих негативное влияние на нормальную трудовую и социальную деятельность личности, стоит особенно отметить паническое расстройство и мигрень.

Состояние патологической тревожности (F41 по МКБ-10) может возникнуть практически у любого человека, но для этого необходимы физические или эмоциональные перегрузки чрезвычайной силы (стихийные бедствия, катастрофы, террористические акты и другие угрожающие жизни ситуации). Однако, часть людей (от 2 до 5% популяции) страдают тревожными расстройствами и подвержены паническим атакам на протяжении всей жизни (Баранов П.А.).

Паническое расстройство (ПР) является мультифакториальным заболеванием: на его развитие влияют как факторы окружающей среды, так и генетические факторы. Доказано, что панические расстройства имеют серьезную генетическую основу: обнаружены свидетельства прямой передачи заболевания из поколения в поколение (заболеванием страдает 15-17% родственников больных 1 степени), а также большой конкордантности у однояйцовых близнецов (80-90%). Величина наследуемости ПР оценивается в 48% (Nettema et al., 2001). Однако генетическая природа этого заболевания остается крайне мало изученной. Предполагается, что ПР может вызываться взаимодействием различных факторов, включающие как наследственные нейрохимические нарушения, так и стресс, вызываемый окружающей средой (Bradwejn, Koszycki, 2001). Не удивительно, что наибольшее распространение и социальная значимость ПР наблюдается в мегаполисах, что объясняется большим количеством внешних факторов, способствующих развитию заболевания при имеющейся генетической предрасположенности.

Широкая распространенность и неясная этиология ПР породила интерес к холецистокинину (ХЦК) как к фактору тревожности, с тех пор, как в 1984 году, Jens

Rehfeld обнаружил, что инъекции пептида, вводимого здоровым добровольцам, вызывают отчетливое чувство тревоги и паники (Rehfeld, Van Solinge, 1992). Центральные рецепторы ХЦК в большой концентрации располагаются в областях ЦНС, участвующих в формировании тревоги. Биологическое действие этого подтипа рецепторов заключается в модуляции ряда классических нейромедиаторов (включая эндогенные опиаты и дофамин) и контроле многих центральных функций. Предполагается, что изменения в активности холецистокининэргической системы (ХЦК-системы), будь это гиперчувствительность рецепторов ХЦК к внутриклеточным ответам, связанным с этими рецепторами, и/или нарушения в обороте ХЦК, могут быть нейробиологической основой панических атак (Bradwejn et al., 1994; Shlik et al., 1997). Одним из возможных механизмов нарушения функции ХЦК-системы могут быть мутации в регуляторных и/или белок-кодирующих областях генов холецистокинина и его рецепторов.

В последнее время в литературе появилось много данных, свидетельствующих о корреляции ряда однонуклеотидных замен в последовательностях генов ХЦК и его рецепторов с развитием и особенностями протекания панических расстройств человека. Однако большинство из них остаются малоизученными, а имеющиеся данные об их влиянии на развитие состояний патологической тревожности противоречивы.

Ассоциативные исследования по генетике тревожных расстройств, включающие все гены холецистокининэргической системы, за рубежом ранее не проводились. Данные по частотам аллелей генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* среди жителей России отсутствуют, то есть исследований по данному направлению в нашей стране ранее не проводилось.

Еще одним социально значимым заболеванием, имеющим генетическую основу, является мигрень. Выделяют два основных типа мигрени: мигрень без ауры и мигрень с аурой. Аурой называются своеобразные, стереотипные ощущения, возникающие непосредственно перед болевым приступом: мелькания перед глазами, вспышки света, искажение восприятия окружающего мира, онемение конечностей, своеобразные ощущения в животе. К возникновению мигрени имеется четкая наследственная предрасположенность, причем вероятность передачи по наследству мигрени с аурой выше, чем мигрени без ауры (Азимова с соавт., 2008).

В 2000 году мигрень была включена в список заболеваний, представляющих глобальное значение и бремя для человечества (Global Burden of Disease 2000), что обусловлено как ее широкой распространенностью, так и значимым влиянием на жизнь пациентов с этим заболеванием (Leonardi et al., 2005). В Европе, где число жителей составляет 450 миллионов, 600 тысяч человек ежедневно отсутствуют на работе или учебе по причине мигрени. По затратам среди всех существующих заболеваний мигрень

занимает 20-е место. Эти затраты включают как экономические потери в связи с невыходом пациентов на работу или значительным снижением их трудоспособности, так и расходы пациентов на лечение (Berg, Stovner, 2005). Таким образом, мигрень в настоящее время рассматривается как хроническое неврологическое заболевание, приводящее не только к выраженной дезадаптации пациентов, но и к значительным экономическим потерям.

В ходе многочисленных исследований было доказано, что к развитию мигрени имеется четкая генетическая предрасположенность (Baloh, 2004; Wessman et al., 2007; De Vries et al., 2006, 2009; Montagna, 2008 и др.). Однако до настоящего времени информация о генах, играющих роль в патогенезе данного заболевания, остается не полной. Одним из наиболее изученных генов, связываемых с мигренью, является ген *MTHFR*, кодирующий фермент 5,10-метилентетрагидрофолат редуктазу (МТГФР) (Hademenos et al., 2001). Экспериментальные исследования показали, что мутация С677Т в гене *MTHFR* достоверно чаще встречается у больных мигренью, чем у здоровых людей (Kara et al., 2003, De Tommaso et al., 2007), причем в ряде работ корреляция обнаружена только для группы пациентов, страдающих мигренью с аурой (Kara et al., 2003, Lea et al., 2004).

Цель исследования.

Целью настоящей работы является анализ частоты встречаемости семи однонуклеотидных замен в генах *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* в случайной выборке и выборке страдающих паническим расстройством жителей Москвы, анализ частоты встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR* в выборке жителей Москвы страдающих мигренью, а также оценка значимости исследованных замен в патогенезе указанных социально значимых заболеваний человека.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту встречаемости семи однонуклеотидных замен в генах *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* в контрольной случайной выборке жителей Москвы. Сопоставить полученные результаты с данными о соответствующих частотах в других крупных городах мира.
2. Оценить частоту встречаемости семи однонуклеотидных замен в генах *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* в выборке индивидуумов страдающих ПР. Провести сравнительный анализ частот аллелей в двух исследуемых выборках.
3. Провести поиск ассоциации комплексных генотипов генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* с часто повторяющимися паническими атаками.

4. Оценить частоту встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR* в выборке пациентов, страдающих мигренью с аурой и мигренью без ауры, проживающих в Москве.

5. Сопоставить генотипы пациентов страдающих мигренью по локусу *С677ТMTHFR* с рядом клинических и электрофизиологических характеристик течения заболевания.

6. Сопоставить генотипы пациентов страдающих мигренью по локусу *С677ТMTHFR* с наличием сопутствующих заболеванию симптомов.

Научная новизна.

В работе впервые изучена частота полиморфных вариантов генов холецистокинергической системы в связи с развитием панического расстройства в выборке жителей Москвы. Обнаружена тенденция к увеличению частоты встречаемости замены -128G/T в гене *ССК1R* в выборке пациентов, страдающих паническими расстройствами по сравнению с контролем. Для остальных изученных однонуклеотидных замен (-36C/T и -325G/A в гене *ССК*, -81A/G и 984T/C в гене *ССК1R*, 109C/T и 1550G/A в гене *ССК2R*) достоверных различий частот аллелей в исследуемых выборках не обнаружено. Проведен поиск ассоциации комплексных генотипов генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* с часто повторяющимися паническими атаками. Обнаружена одна комбинация аллелей (-36Т *ССК*, -128Т *ССК1R*) достоверно чаще встречающаяся в выборке больных ПР по сравнению с контрольной выборкой.

Получены данные о частоте встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR* в выборке жителей Москвы, страдающих мигренью с аурой и мигренью без ауры. В результате сравнительного анализа подтверждена роль аллеля 677Т гена *MTHFR* как фактора риска развития мигрени с аурой. Впервые проведен анализ на наличие у пациентов с мигренью с аурой и мигренью без ауры, имеющих разные генотипы по локусу *677MTHFR*, таких сопутствующих симптомов, как тошнота, фото- и фонофобия, а также на чувствительность к различным провокаторам мигренозного приступа. Наибольшая представленность сопутствующих симптомов, а также чувствительность к провокаторам мигренозного приступа обнаружена у больных с ТТ-генотипом по локусу *677MTHFR*.

Научно-практическая значимость.

Полученные в работе результаты расширяют представления о генетической основе двух социально значимых неврологических заболеваний человека. Результаты, полученные в данной работе, могут быть использованы в фундаментальных исследованиях, касающихся выяснения патогенетических механизмов панического

расстройства и мигрени, для создания диагностических тест-систем, а также для оптимизации подходов к лечению пациентов, страдающих паническим расстройством или мигренью.

Апробация работы.

Результаты исследования представлены на V съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009), на Международной научной конференции, посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси (Минск, 2010), на 15-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2011). Полученные в ходе работы данные были доложены на отчетных сессиях (февраль 2009, март 2010).

Декларация личного участия автора.

Диссертация написана автором лично с использованием собственных результатов. Работа с пациентами и постановка клинического диагноза проводились сотрудниками отдела клинической неврологии ММА им. И.М. Сеченова к.м.н. Азимовой Ю.Э. и к.м.н. Фокиной Н.М. Забор образцов крови проводился квалифицированным медицинским персоналом клиники нервных болезней им. А.Я.Кожевникова. Автор самостоятельно осуществлял выделение ДНК, постановку АС-ПЦР и ПЦР-ПДРФ, электрофоретический анализ. Статистическая обработка полученных результатов проведена совместно с к.б.н. Фаворовым А.В. и Львовс Д. Обсуждение результатов исследования и написание научных публикаций проводилось при участии научного руководителя д.б.н. Климова Е.А. Процент личного участия в экспериментальных исследованиях составил не менее 80%.

Публикации.

По результатам работы опубликовано 11 печатных работ, из них две статьи в журнале, рецензируемом ВАК и 9 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 122 страницах машинописного текста и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы, список использованной литературы и приложение. Работа иллюстрирована 23 таблицами, 14 рисунками и 4 приложениями. Список литературы включает 210 источников, большинство ссылок на английском языке.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

В обзоре литературы рассматриваются общая характеристика, эпидемиология, клинические проявления и патогенез панического расстройства и мигрени, систематизируются данные об ассоциации полиморфных вариантов генов с развитием панического расстройства, дается характеристика холецистокинина, его рецепторов и их физиологической роли. В данном разделе подробно изложена информация о генах-кандидатах, предположительно участвующих в патогенезе мигрени и панического расстройства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Материалом для исследования послужили образцы крови больных паническими расстройствами и мигренью предоставленные отделом клинической неврологии ММА им. И.М. Сеченова. В работе исследовались образцы ДНК, выделенной из цельной крови пациентов, с диагнозом паническое расстройство, соответствующим критериям DSM-IV. Объем выборки 76 человек, из них 64 женщины и 12 мужчин в возрасте от 19 до 72 лет, все пациенты - проживающие в Москве и ближайшем Подмосковье. В подавляющем большинстве случаев (около 95% выборки) возраст дебюта заболевания у обследованных пациентов приходился на период до 40 лет. В качестве контроля в работе использовались образцы ДНК, выделенной из цельной крови добровольцев, проживающих в Москве. Объем контрольной выборки 170 человек, выборка разнородна по половозрастному составу (107 женщин и 63 мужчины в возрасте от 18 до 57 лет). Забор крови проводился на московской станции переливания крови.

Объем выборки пациентов с мигренью составил 83 человека, проживающих в Москве, из них 71 женщина и 12 мужчин в возрасте от 18 до 69 лет. Постановка диагноза мигрень с аурой или мигрень без ауры проводилась в соответствии с критериями Международной классификации головной боли II (2003г). Группу контроля составили 50 здоровых лиц, сопоставимых по полу и возрасту.

Все пациенты, принимающие участие в нашем исследовании были ознакомлены с целями работы и подписали информированное согласие. Данная работа одобрена локальным Этическим комитетом Учреждения Российской Академии наук Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Выделение ДНК.

Геномную ДНК выделяли из цельной крови с помощью метода, основанного на использовании в качестве лизирующего реагента гуанидинтиоцианата, который эффективен также для солюбилизации клеточного дебриса и денатурации клеточных нуклеаз (набор реагентов DIAtom™ DNA Prep, набор Magna™ DNA Prep 200, фирма «IsoGene», Москва).

Выделение ДНК проводили согласно прописям, представленным фирмой-изготовителем, под ламинатором во избежание загрязнения помещения и последующей контаминации.

Подбор праймеров и оптимизация условий ПЦР.

Праймеры к нужным фрагментам 5'- регуляторных и кодирующих областей генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* подобраны нами с помощью программы “Primer 5.0” или вручную (таблица 1). Температуру отжига для каждой пары праймеров, использованной в работе, подбирали опытным путем, принимая за исходную – температуру, рассчитанную с использованием программы “OligoCalculator”. При отработке условий ПЦР в качестве матрицы использовалась геномная ДНК человека.

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе.

Название	Последовательность праймеров	T _{отж} , °C	Ген	Замена (регистрационный номер в NCBI)	Размер продукта (п.н.)
ССК7,8	F: CCAACGCTGACGCAGACTG R: GAAGCTTCTCGGATCCAGA	64	<i>ССК</i>	-36C/T (rs1157184)	168
ССК3,4-F ССК7,8-R	F: GCTCTACCCACCCAGACCTC R: GAAGCTTCTCGGATCCAGA	65	<i>ССК</i>	-325G/A (rs1799923)	498
ССК-AR	F: GCATATGTACACATGTGTGTA AAGCAGCCAGAC R: GCCCTTTCCTGGGCCAGACT	64	<i>ССК1R</i>	-81A/G (rs1799723) -128G/T (rs1800908)	103
ССКBR-2	F: CATGGAGCTGCTAAAGCTGAAC R: CTGGGGTACAGTGAGAAATAGC	60	<i>ССК2R</i>	109C/T (rs1805000)	203
ССКBR-3	F: CTGGCAGTCAGCGACCTCCT R: CACAAGCATCAGTGGGACTTC	62	<i>ССК2R</i>	1550G/A (rs1805002)	237
ССК1R-1	F: ATCGTGGGTCCAGTGATGT R: GGCTCCTTTGCTGTGATTGT	63	<i>ССК1R</i>	984T/C (rs1800857)	472

Анализ частот однонуклеотидных замен.

Анализ частот однонуклеотидных аллелей проводился с помощью метода ПЦР-ПДРФ для всех замен в генах холецистокининергической системы (список эндонуклеаз рестрикции представлен в таблице 2) и метода аллель-специфической ПЦР для замены С677Т в гене *MTHFR* с использованием набора GenePak® *MTHFR* PCR test («IsoGene», Москва).

Детекция продуктов рестрикции или амплификации проводилась в 2% агарозном геле, приготовленном по стандартной прописи (Маниатис и др., 1984). После электрофореза гель фотографировали в коротковолновом УФ-свете (длина волны 312 нм) с выводом данных на экран монитора компьютера (использовалась геледокументирующая система ViTran).

Таблица 2. Характеристика эндонуклеаз, использованных в работе и условия рестрикции.

Рестриктаза	Замена и регистрационный номер в NCBI	Ген	Температура инкубации, °С	Сайт узнавания
BsII	C/T(-36) rs11571842	<i>CCK</i>	55	<i>CCNNNNN↓NNGG</i> <i>GGNN↑NNNNNCC</i>
SmaI (FauI)	G/A(-325) rs1799923	<i>CCK</i>	37	<i>CCCGC(N)₄↓</i> <i>GGGCG(N)₆↑</i>
HinfI	A/G(-81) rs1799723, G/T(-128) rs1800908	<i>CCK1R</i>	37	<i>G↓ANTC</i> <i>CTNA↑G</i>
PstI	T/C (984) rs1800857	<i>CCK1R</i>	37	<i>CTGCA↓G</i> <i>G↑ACGT C</i>
BstDEI	C/T(109) rs1805000	<i>CCK2R</i>	60	<i>C↑TNAG</i> <i>GANT↓C</i>
Bst4CI	G/A (1550) rs1805002	<i>CCK2R</i>	65	<i>ACN↑GT</i> <i>TG↓NCA</i>

Программы для статистической обработки данных.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных подходов, используемых при проведении популяционно-генетических исследований. Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов с целью выявления ассоциации с ПР или с мигренью и тест на соответствие выборок равновесию Харди-Вайнберга проводили с использованием метода χ^2 . Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Для определения риска заболевания у носителей определенных аллелей и генотипов вычислялось отношение шансов (OR – odds ratio) с 95% доверительным интервалом (95% C.I. – Confidence Interval). Для вычисления этих показателей использовалась программа DeFinetti на сайте Института генетики человека (Мюнхен, Германия, <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). Анализ на совместное наследование изученных однонуклеотидных замен проводился с помощью компьютерной программы Arlequin 3.11.

Поиск комбинаций аллелей генов ассоциированных с ПР проведен с помощью программного обеспечения APSampler 3.5.8. Программа APSampler 3.5.8. основана на методе MCMC (Markov chain Monte Carlo technique). Достоверность выявленных этой программой ассоциаций генотипов с ПР верифицировали с помощью точного критерия Фишера, с последующей валидацией результатов с помощью стандартного пермутационного теста. Силу ассоциации выражали в значениях отношения шансов (OR – odds ratio) с 95% доверительным интервалом (95% C.I. – Confidence Interval). Достоверным считали различия сравниваемых частот при значении $p < 0,05$. Для визуализации данных в

виде диаграммы Венна использовалась программа Google Chart API, доступная по ссылке <http://www.mql5.com/ru/articles/114>.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

Полиморфизм генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* и панические расстройства.

Для изучения частоты встречаемости полиморфных вариантов генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* в выборке пациентов, страдающих ПР, и случайной (контрольной) выборке использовался метод ПЦР-ПДРФ. Для каждой из семи исследованных однонуклеотидных замен была подобрана схема детекции, включающая праймеры для амплификации соответствующего фрагмента геномной ДНК и специфическую эндонуклеазу рестрикции, сайт узнавания которой появляется или пропадает в результате замены соответствующего нуклеотида в последовательности ДНК.

Изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *ССК*.

Изучены частоты встречаемости двух однонуклеотидных замен (-36С/Т, -325G/А), расположенных в 5'-регуляторной области гена *ССК*. Результаты исследования частот полиморфных вариантов гена *ССК* в выборке пациентов, страдающих паническим расстройством, и случайной (контрольной) выборке представлены в таблице 3. Наблюдаемое распределение частот генотипов по исследованным локусам соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга как в выборке пациентов с ПР, так и в контрольной выборке.

Таблица 3. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *ССК*.

Замена	Частоты генотипов (P)			Частоты аллелей (P±S(p))	
	СС	СТ	ТТ	С	Т
Замена -36С/Т					
Больные ПР (n=76)	0,211	0,447	0,342	0,434±0,057	0,566±0,057
Контроль (n=170)	0,194	0,447	0,359	0,418±0,038	0,582±0,038
	$\chi^2=0,11$; d.f.=2; p=0,741			$\chi^2=0,12$; d.f.=1; p=0,731; OR=0,934; 95% C.I.=[0,635-1,375]	
Замена -325G/А					
Больные ПР (n=76)	0,803	0,197	0,000	0,901±0,034	0,099±0,034
Контроль (n=170)	0,818	0,165	0,177	0,900±0,023	0,100±0,023
	$\chi^2=0,00$; d.f.=2; p=0,965			$\chi^2=0,00$; d.f.=1; p=0,964; OR=0,985; 95% C.I.=[0,520-1,869]	

Примечания: n – объем выборки, P – частота аллеля или генотипа в долях, S(p) – стандартная ошибка, χ^2 - значение хи-квадрат, d.f. – число степеней свободы, p – значение достоверности, OR (odds ratio) – отношение шансов, 95% C.I. – 95%-ный доверительный интервал (Confidence Interval).

Известно, что однонуклеотидная замена -36С/Т в гене *ССК* приводит к изменению сайта связывания фактора транскрипции Sp1, что в свою очередь влечет за собой снижение транскрипционной активности этого гена (Kadonaga et al., 1986). Исследователями из Японии было установлено, что частота замены -36С/Т достоверно выше у людей, страдающих паническими и тревожными расстройствами по сравнению со здоровыми добровольцами (Wang et al., 1998). Однако в ряде последующих работ такой ассоциации обнаружено не было (Hamilton et al., 2001; Hosing et al., 2004). А исследователи из Дании, напротив, обнаружили протекторную роль замены -36С/Т (Koefoed et al., 2010).

По нашим данным частота этой замены в контрольной выборке и выборке больных ПР достоверно не отличается ($\chi^2=0,12$; $p=0,731$), что позволяет предположить отсутствие значимого вклада этой замены в развитие заболевания. Однако, учитывая результаты других исследований, не представляется возможным сделать однозначный вывод о роли однонуклеотидной замены -36С/Т в гене *ССК* в патогенезе ПР.

Однонуклеотидная замена -325G/A также располагается в 5'-регуляторной области гена *ССК*, но является менее изученной по сравнению с первой заменой (-36С/Т). Полученные нами частоты замены -325G/A в контрольной выборке и выборке пациентов с паническим расстройством также достоверно не отличаются ($\chi^2=0,00$; $p=0,964$).

Таким образом, согласно полученным данным, изученные полиморфные варианты гена *ССК* не являются значимыми с точки зрения риска развития патологической тревожности.

Изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *ССК1R*.

Изучены частоты встречаемости трех однонуклеотидных замен в гене *ССК1R*, две из них расположены в промоторной области гена (-81A/G и -128G/T), а третья (984T/C) расположена на границе первого интрона и второго экзона и, по всей видимости, может изменять сайт сплайсинга данного гена (Koefoed et al., 2009). Полученные значения частот генотипов и аллелей гена *ССК1R* приведены в таблице 4. Во всех случаях наблюдаемое распределение частот генотипов по полиморфным локусам гена *ССК1R* в исследованных выборках соответствовало теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Таблица 4. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *ССК1R*.

Замена -81A/G	Частоты генотипов (P)			Частоты аллелей (P±S(p))	
	AA	AG	GG	A	G
Больные ПР (n=76)	0,869	0,131	0,000	0,934±0,028	0,066±0,028
Контроль (n=170)	0,906	0,094	0,000	0,953±0,016	0,047±0,016
	$\chi^2=0,78$; d.f.=2; p=0,377			$\chi^2=0,74$; d.f.=1; p=0,391; OR=1,426; 95% C.I.=[0,632-3,220]	
Замена -128G/T	GG	GT	TT	G	T
Больные ПР (n=76)	0,882	0,118	0,000	0,941±0,027	0,059±0,027
Контроль (n=170)	0,953	0,047	0,000	0,977±0,012	0,023±0,012
	$\chi^2=4,16$; d.f.=2; p=0,041			$\chi^2=4,01$; d.f.=1; p=0,045; OR=2,612; 95% C.I.=[0,988-6,906]	
Замена 984T/C	TT	TC	CC	T	C
Больные ПР (n=76)	0,763	0,197	0,039	0,862±0,040	0,138±0,040
Контроль (n=170)	0,717	0,265	0,018	0,850±0,027	0,150±0,027
	$\chi^2=0,12$; d.f.=2; p=0,734			$\chi^2=0,12$; d.f.=1; p=0,731; OR=0,908; 95% C.I.=[0,525-1,572]	

Примечания: n – объем выборки, P – частота аллеля или генотипа в долях, S(p) – стандартная ошибка, χ^2 - значение хи-квадрат, d.f. – число степеней свободы, p – значение достоверности, OR (odds ratio) – отношение шансов, 95% C.I. – 95%-ный доверительный интервал (Confidence Interval).

Инвариантные позиции – (-81A/G) и (-128G/T) впервые обнаружены в ходе исследования полиморфных вариантов промоторной области гена *ССК1R* (Miyasaka et al., 2004a). Установлено достоверное увеличение частоты -81G и -128T аллелей у пациентов, страдающих паническим расстройством (Miyasaka et al., 2004a, 2007) и шизофренией (Tachikawa et al., 2001). Также получены экспериментальные доказательства повышенной частоты встречаемости аллеля -81G гена *ССК1R* у людей с алкогольной зависимостью (Miyasaka et al., 2004b). Известно, что две эти замены наследуются преимущественно совместно (Miyasaka et al., 2004a).

Полученные нами данные также свидетельствуют о повышении частоты встречаемости аллелей -81G и -128T в выборке пациентов страдающих паническим расстройством по сравнению с контролем, однако, после статистической обработки лишь для одной из замен (-128G/T) корреляция признана достоверной ($\chi^2=4,01$, p=0,045).

Однонуклеотидная замена 984T/C расположена на границе первого интрона и второго экзона гена *ССК1R* (изменяется пятый нуклеотид от начала экзона). Ранее другими авторами показано незначительное увеличение частоты аллеля 984T гена *ССК1R*

у больных страдающих ПР по сравнению с контролем, что может указывать на протекторную роль замены Т/С в патогенезе заболевания (Ise et al., 2003, Koefoed et al., 2010). По нашим данным частота замены 984 Т/С в выборке пациентов с диагнозом ПР сходна с таковой в контрольной выборке (таблица 4), что свидетельствует об отсутствии значимого влияния данной замены на развитие заболевания.

Таким образом, в ходе изучения частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *ССК1R*, обнаружена одна однонуклеотидная замена достоверно чаще встречающаяся в выборке пациентов, страдающих паническим расстройством, по сравнению с контрольной выборкой.

Изучение частоты встречаемости полиморфных вариантов гена *ССК2R*.

В гене рецептора холецистокинина 2-го типа (*ССК2R*) были исследованы две однонуклеотидные замены 109С/Т и 1550G/А, располагающиеся в кодирующей части гена и приводящие к аминокислотным заменам (Leu37Phe и Val125Ile, соответственно) в последовательности рецептора (Tachikawa et al., 1999). Частоты полиморфных вариантов гена *ССК2R* в выборке пациентов, страдающих паническим расстройством, и контрольной выборке представлены в таблице 5.

*Таблица 5. Распределение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов гена *ССК2R*.*

Замена 109С/Т	Частоты генотипов (P)			Частоты аллелей (P±S(p))	
	СС	СТ	ТТ	С	Т
Больные ПР (n=76)	0,908	0,092	0,000	0,954±0,024	0,046±0,024
Контроль (n=170)	1,000	0,000	0,000	1,000±0,000	0,000±0,000
	$\chi^2=16,12$; d.f.=2; p=0,00006			$\chi^2=15,88$; d.f.=1; p=0,00048; OR=35,103; 95% C.I.=[1,992-618,671]	
Замена 1550G/А	GG	GA	AA	G	A
Больные ПР (n=76)	0,750	0,224	0,026	0,862±0,040	0,138±0,040
Контроль (n=170)	0,818	0,159	0,023	0,897±0,023	0,103±0,023
	$\chi^2=1,16$; d.f.=2; p=0,282			$\chi^2=1,29$; d.f.=1; p=0,256; OR=1,397; 95% C.I.=[0,783-2,491]	

Примечания: n – объем выборки, P – частота аллеля или генотипа в долях, S(p) – стандартная ошибка, χ^2 - значение хи-квадрат, d.f. – число степеней свободы, p – значение достоверности, OR (odds ratio) – отношение шансов, 95% C.I. – 95%-ный доверительный интервал (Confidence Interval).

При оценке соответствия распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга в исследуемых выборках было выявлено, что данному равновесию соответствует соотношение частот генотипов по локусу 109С/Т в выборке пациентов с ПР и по локусу 1550G/А в выборке пациентов с ПР и контрольной выборке. Наблюдаемое распределение

частот генотипов по локусу 109С/Т в контрольной выборке не соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга. Несоответствие равновесию Харди-Вайнберга, по всей видимости, объясняется небольшим объемом исследованной выборки и низкой частотой встречаемости замены 109С/Т в популяции, в результате чего в контрольную выборку не вошли носители 109Т аллеля гена *ССК2R*.

Нами показано достоверное увеличение частоты встречаемости аллеля 109Т в выборке больных с диагнозом ПР по сравнению с контролем ($\chi^2=15,88$; $p=0,00048$), однако несоответствие равновесию Харди-Вайнберга в контрольной выборке не позволяет сделать однозначный вывод о роли данной замены в этиологии ПР. Интересно отметить, что в контрольной выборке необследованных жителей Москвы не было найдено ни одного случая замены С/Т в положении 109 гена *ССК2R*, тогда как частота этой замены в выборке больных составила 4,6% (7 из 76 пациентов с диагнозом ПР оказались гетерозиготами по исследуемому аллелю). В литературе не представлено работ по исследованию роли однонуклеотидной замены 109С/Т в развитии ПР. Однако ранее было показано, что данная замена приводит к изменению в аминокислотной последовательности рецептора *ССК2R* (Leu37Phe). Аминокислотная замена затрагивает одну из экстрацеллюлярных петель белка, и, таким образом, может влиять на способность *ССК2R* рецептора передавать G-белок-опосредованный сигнал в клетку (Tachikawa et al., 1999), что может иметь значительный физиологический эффект.

Однонуклеотидная замена 1550G/A, также как и предыдущая замена (109С/Т), приводит к изменению аминокислотной последовательности рецептора *ССК2R* (Val1125Ile). Аминокислотная замена приходится на экстрацеллюлярную петлю между вторым и третьим трансмембранными доменами белка. Однако не достаточно хорошо изученная третичная структура рецептора *ССК2R*, а именно отсутствие данных об устройстве лиганд-связывающего сайта в этой петле, не позволяют оценить возможный вклад данного полиморфного варианта в функционирование рецептора.

По нашим данным частота встречаемости замены 1550G/A в гене *ССК2R* несколько повышена в выборке пациентов страдающих паническим расстройством по сравнению с контролем (таблица 5), однако после статистической обработки, ассоциация признана недостоверной. По всей видимости, данная однонуклеотидная замена не играет значимой роли в патогенезе ПР.

Таким образом, полученные нами данные не подтверждают наличие весомого вклада изученных полиморфных вариантов гена *ССК2R* в развитии панического расстройства. Однако факт обнаружения однонуклеотидной замены 109С/Т только в

выборке пациентов с ПР, но не в контрольной выборке, представляется весьма интересным и требует дополнительных исследований.

Поиск ассоциации комплексных генотипов генов *CCK*, *CCK1R* и *CCK2R* с часто повторяющимися паническими атаками.

С помощью программного обеспечения APSampler 3.5.8. был проведен комплексный анализ полученных данных, целью которого являлось выявление комбинаций аллелей по семи исследованным локусам (-36C/T *CCK*, -325G/A *CCK*, -81A/G *CCK1R*, -128G/T *CCK1R*, 984T/C *CCK1R*, 109C/T *CCK2R*, 1550G/A *CCK2R*) ассоциированных с развитием панического расстройства. Для определения достоверности выявленных ассоциаций использовался точный критерий Фишера.

В результате анализа была выявлена одна комбинация аллелей (-36T *CCK*, -128T *CCK1R*) достоверно чаще встречающаяся в выборке больных ПР по сравнению с контрольной выборкой (p (Fisher's exact p-value) = 0.0156255, OR=3.67164, C.I. (95%)=[1.25766 - 10.71910]). Интересен тот факт, что достоверная ассоциация с ПР обнаружена нами только по локусу -128T ($\chi^2=4,01$, $p=0,045$; p (Fisher's exact p-value) = 0,04227282), тогда как частота встречаемости замены -36C/T достоверно не отличалась в группе больных ПР и контрольной группе ($\chi^2=0,12$, $p=0,731$; p (Fisher's exact p-value) = 0,42365). По-видимому, это может объясняться наличием эпистатического взаимодействия между рассматриваемыми генами (*CCK*, *CCK1R*). Данное взаимодействие схематически отображено в виде диаграммы Венна на рисунке 1.

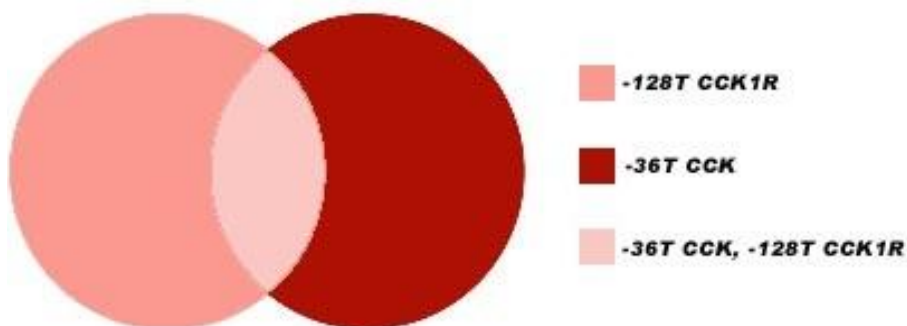


Рисунок 1. Диаграмма Венна. Схематическое отображение эпистатического взаимодействия генов *CCK* и *CCK1R*. В виде кружков изображены аллели генов *CCK* и *CCK1R*, в виде пересечения кружков - комбинация этих аллелей (обозначения на рисунке). Интенсивность окраски кружков и их пересечения пропорциональна значениям Fisher's exact p-value ($p=0,42365$ для аллеля -36T *CCK*, $p=0,04227282$ для аллеля -128T *CCK1R*, $p=0,0156255$ для комбинации аллелей -36T *CCK* и -128T *CCK1R*).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительно более высоком уровне ассоциации комбинации аллелей -36T *CCK*, -128T *CCK1R* с развитием панического

расстройства по сравнению с вкладом каждой из этих однонуклеотидных замен по отдельности.

Полиморфизм гена *MTHFR* и мигрень.

Изучение частоты встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR*.

Частота встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR* в выборке пациентов с мигренью, проживающих в Москве, определялась методом аллель-специфической ПЦР с использованием коммерческого набора GenePak® *MTHFR* PCR test. Принцип метода заключается в том, что при полном совпадении последовательности специфических праймеров с комплементарной матрицей аллеля гена *MTHFR* амплифицируется соответствующая последовательность, а при несовпадении последнего нуклеотида на 3'-конце специфического праймера с комплементарной матрицей аллеля специфическая реакция не проходит. В той же реакции используется пара неспецифических праймеров, которая является комплементарной к обоим аллелям гена *MTHFR* и служит внутренним контролем реакции. Каждый неспецифический праймер создает с одним из специфических пар и амплифицирует специфический продукт ПЦР определенного размера. Таким образом, гомозиготе по аллелю С соответствует набор фрагментов 399 и 262 п.н., гетерозиготе – набор фрагментов 399, 262 и 174 п.н., и, наконец, гомозиготе по аллелю Т – набор фрагментов 399 и 174 п.н. Типичная картина электрофоретического разделения продуктов аллель-специфической амплификации представлена на рисунке 2.

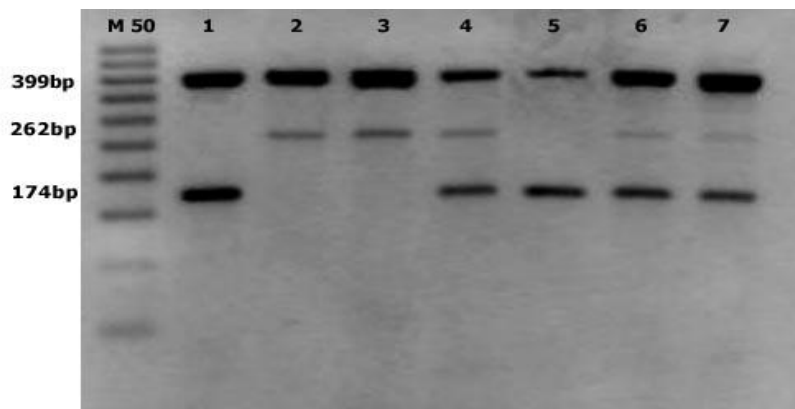


Рисунок 2. Электрофореграмма разделения продуктов АС-ПЦР в 2%-ом агарозном геле. Для амплификации использовался коммерческий набор GenePak® *MTHFR* PCR test. Образцы 2 и 3 – гомозиготы СС, образцы 4, 6, 7 – гетерозиготы СТ, образцы 1 и 5 – гомозиготы по аллелю Т.

Полученные частоты аллелей и генотипов по локусу С677Т в выборке пациентов с диагнозом мигрень и контрольной выборке представлены в таблице 6. Наблюдаемое распределение частот генотипов в исследованных выборках по локусу С677Т соответствует теоретически ожидаемому равновесному распределению Харди-Вайнберга.

Таблица 6. Частота встречаемости однонуклеотидной замены С677Т в гене *MTHFR* в выборке пациентов с мигрень и контрольной выборке.

Замена С677Т	Частоты генотипов (P)			Частоты аллелей (P±S(p))	
	СС	СТ	ТТ	С	Т
Больные мигренью (n=83)	0,385	0,398	0,217	0,584±0,054	0,416±0,054
Контроль (n=50)	0,520	0,400	0,080	0,720±0,072	0,360±0,072
	$\chi^2=4,35$; d.f.=2; p=0,037			$\chi^2=4,96$; d.f.=1; p=0,026; OR= 1,829; 95% C.I. =[1.072-3.122]	

Примечания: n – объем выборки, P – частота аллеля или генотипа в долях, S(p) – стандартная ошибка, χ^2 - значение хи-квадрат, d.f. – число степеней свободы, p – значение достоверности, OR (odds ratio) – отношение шансов, 95% C.I. – 95%-ный доверительный интервал (Confidence Interval).

Согласно полученным данным частота встречаемости замены С677Т в выборке пациентов с мигренью достоверно выше частоты замены в выборке здоровых лиц ($\chi^2=4,96$, p=0,026). Эти результаты хорошо согласуются с данными полученными ранее в других ассоциативных исследованиях (Kara et al., 2003, Lea et al., 2004, De Tommaso et al., 2007). Известно, что транзигция цитозина на тимин в позиции 677 гена *MTHFR* приводит к замене остатка аланина на остаток валина (Ala222Val) в участке аминокислотной последовательности фермента, который приходится на сайт связывания фолата. В результате этого формируется термолабильная форма белка *MTHFR* со сниженной ферментативной активностью (у гомозигот ТТ677 активность снижается до 35% от среднего значения), что сопровождается повышением уровня гомоцистеина в крови (Frosst et al., 1995). Развитие гипергомоцистеинемии приводит к сенситизации болевых рецепторов твердой мозговой оболочки (Storer, Goadsby, 1997) и гипервозбудимости нейронов коры головного мозга (Oterino et al., 2004). Гомоцистеин также повреждает эндотелий сосудистой стенки и вызывает выброс оксида азота (NO), приводя к нарушениям тонуса сосудистой стенки и свертываемости крови (Lea et al., 2004). По всей видимости, все эти эффекты могут обеспечивать предрасположенность носителей мутации С677Т в гене *MTHFR* к мигрени.

Анализ клинико-демографических показателей в группах пациентов с различными генотипами по локусу 677*MTHFR*.

Полученные частоты аллелей и генотипов по локусу 677*MTHFR* в выборке пациентов с мигренью были сопоставлены с рядом клинико-демографических показателей исследованной выборки (таблица 7). Стоит отметить, что мигрень с аурой достоверно чаще встречалась в группе пациентов-носителей Т-аллеля (37.2%) по сравнению с пациентами с СС генотипом (0%), p<0.0001 (таблица 16), что подтверждает возможность

рассмотрения аллеля 677Т гена *MTHFR* в качестве фактора риска развития мигрени с аурой.

Таблица 7. Клинико-демографические показатели в группах пациентов с различными генотипами *MTHFR*.

Показатель	СС-генотип	СТ-генотип	ТТ-генотип	Носители Т-аллеля
Общее число обследованных пациентов, N (%)	32 (38.5)	33 (39.8)	18 (21.7)	51 (61.5)
Возраст (годы)	41.9±11.8	42.8±13.7	47.9±12.8	43.4±13.6
Число пациентов с мигренью с аурой / с мигренью без ауры, (%)	0/32 (0/100)	14/19 (42.4/57.6)	5/13 (27.7/72.3)	19/32 (37.2/62.8)
Частота приступов в месяц	3.7±5.6	5.8±6.5	5.6±8.9	5.9±7.1

По нашим данным группы пациентов с мигренью с различными генотипами не различаются по возрасту и полу. Пациенты, страдающие как мигренью с аурой, так и мигренью без ауры, с различными генотипами по локусу 677*MTHFR*, статистически значимо не различаются по частоте и продолжительности приступов мигрени.

Анализ на наличие сопутствующих симптомов у пациентов, страдающих мигренью, с различными генотипами по локусу 677*MTHFR*.

После определения генотипов по локусу 677*MTHFR*, был проведен анализ на наличие у пациентов с мигренью таких сопутствующих симптомов, как тошнота, фото- и фонофобия, а также на чувствительность к различным провокаторам мигренозного приступа.

Показано, что у больных с ТТ-генотипом имеет место большая представленность трех рассматриваемых сопутствующих симптомов (рисунок 3). После статистической обработки различия оказались достоверны для каждого из трех симптомов ($p < 0,01$). Кроме этого, пациенты с ТТ генотипом достоверно чаще (100% пациентов) по сравнению с больными СС-генотипа (63,6%), $p=0.002$, и СТ-генотипа (82.6%), $p=0.04$, отмечают чувствительность к провокаторам мигренозного приступа (перемене погоды, нарушению режима сна, пищевым провокаторам).

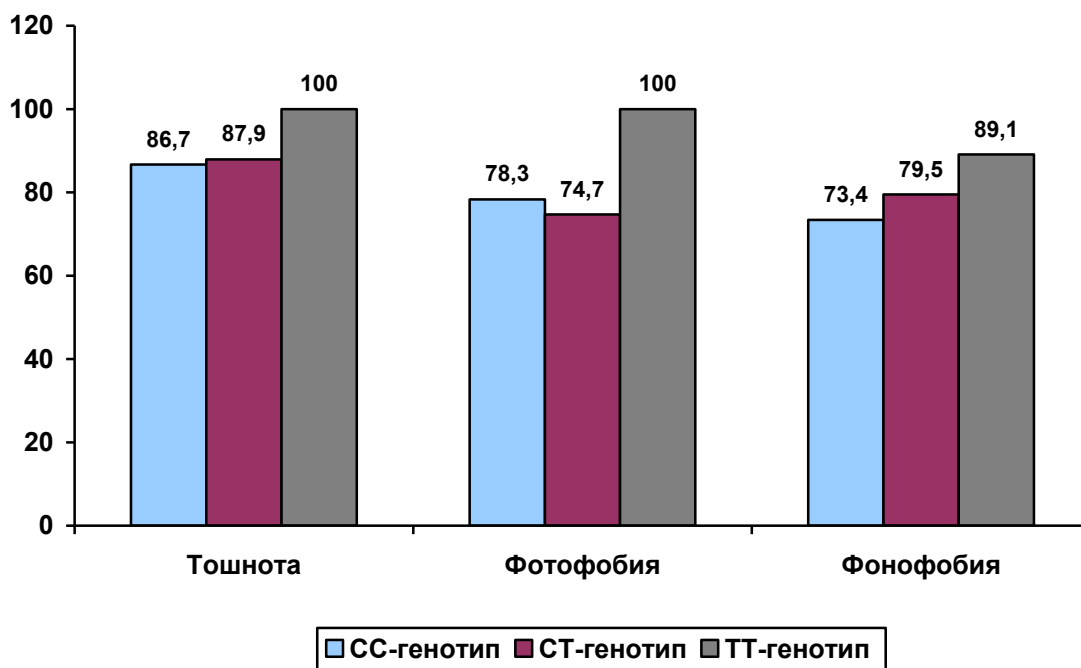


Рисунок 3. Представленность сопутствующих симптомов (тошнота, фото- и фонофобия) у пациентов с различными генотипами по локусу *677MTHFR*. По оси ординат указано количество пациентов с соответствующим генотипом в процентах.

Таким образом, наличие генотипа ТТ по локусу *677MTHFR* коррелирует не только с повышенным риском развития мигрени с аурой, но и целым рядом симптомов, отягчающих течение заболевания, при этом не оказывая влияния на частоту и продолжительность приступов мигрени.

ВЫВОДЫ.

1. Впервые определены частоты встречаемости семи однонуклеотидных замен в генах *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* в выборке пациентов, страдающих паническим расстройством и случайной выборке жителей Москвы.

2. Обнаружена тенденция к увеличению частоты встречаемости замены -128G/T в гене *ССК1R* ($\chi^2=4,01$, $p=0,045$), в выборке пациентов, страдающих паническим расстройством по сравнению с контрольной случайной выборкой жителей Москвы.

3. Выявлена комбинация аллелей (-36T *ССК*, -128T *ССК1R*) достоверно чаще встречающаяся в выборке пациентов, страдающих паническим расстройством по сравнению с контрольной выборкой ($p = 0.0156255$, $OR=3.67164$, $C.I. (95\%)=[1.25766 - 10.71910]$).

4. Частота встречаемости замены С677Т в гене *MTHFR* в выборке пациентов с мигренью достоверно выше частоты замены в выборке здоровых лиц ($\chi^2=4,96$, $p=0,026$).

5. Мигрень с аурой достоверно чаще встречалась в группе пациентов-носителей Т-аллеля локуса *677MTHFR* по сравнению с группой пациентов с СС генотипом ($p < 0,0001$).

6. У больных мигренью с аурой и мигренью без ауры с ТТ-генотипом по локусу *677MTHFR* имеет место большая представленность сопутствующих симптомов (тошнота, фотофобия, фонофобия) и отмечена повышенная чувствительность к провокаторам мигренозного приступа (перемене погоды, нарушению режима сна, пищевым провокаторам).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Коробейникова Л.А., Климов Е.А. Полиморфизм генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* у жителей Москвы // Медицинская генетика. 2010. Т.9. №4, С.40-43.
2. Л.А. Коробейникова, Ю.Э. Азимова, Н.М. Фокина, О.И. Рудько, Е.А. Климов. Частоты аллелей генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* у жителей Москвы, страдающих паническими расстройствами // Медицинская генетика. 2011. №3. С. 37-42.

Тезисы конференций:

1. Е.А. Климов, Л.А. Коробейникова, О.М. Рябинина, Ю.Э. Азимова, О.И. Рудько. Полиморфизм гена *ССК* и тревожные расстройства // Материалы XV международной конференции и дискуссионного научного клуба “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии (IT + M&Eс’2007)”. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 31 мая – 09 июня 2007. С.32-34.
2. L.A. Korobeinikova, O.M. Ryabinina, Yu.E. Azimova, O.I. Rud’ko, E.A. Klimov. Polymorphism of 5’-regions of *ССК* and *ССКAR* human genes // Abstract of “Conference for young scientists, PhD students and students on molecular biology and genetics, dedicated to 120th anniversary of N.I. Vavilov”. Ukraine, Kiev, 20-22 September 2007. P.22.
3. Л.А. Коробейникова, Ю.Э. Азимова, Е.А. Климов. Полиморфизм 5’-регуляторной области гена холецистокинина человека. Сборник тезисов 12^{ой} Пушкинской школы-конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века”. Пушкино, 10-14 ноября 2008. С.34.
4. Л.А. Коробейникова, Ю.Э. Азимова, Е.А. Климов. Полиморфизм генов холецистокининовой системы мозга человека // Материалы Съезда генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и V Съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. 21 - 27 июня 2009 года. Москва. Часть II. С.119.
5. Климов Е.А., Азимова Ю.Э., Коробейникова Л.А., Шайхаев Г.О., Рудько О.И., Табеева Г.Р. Анализ аллельного состояния гена *MTHFR* у больных мигренью: результаты пилотного эксперимента // Медицинская генетика. 2010. 5. С.84. Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков. Ростов-на-Дону. 15-18 мая 2010.

6. Л.А. Коробейникова, Е.А. Климов. Частоты аллелей генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* у жителей Москвы. // Материалы I международной научно-практической конференции "Беккеровские чтения". Волгоград. 27-29 мая 2010. С.115-117.
7. Климов Е.А., Коробейникова Л.А., Азимова Ю.Э., Рудько О.И. Роль аллельных вариантов генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* в развитии панических расстройств у жителей Москвы // Тезисы XXI съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. 19-25 Сентября 2010. Калуга. С.272-273.
8. Л.А. Коробейникова, Е.А. Климов, Ю.Э. Азимова, О.И. Рудько. Частоты аллелей генов *ССК*, *ССК1R* и *ССК2R* у условно-здоровых и страдающих паническими расстройствами жителей Москвы // Материалы Международной научной конференции, посвященной 45-летию основания Института генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси. 25-29 октября 2010 года. Минск. С.135.
9. Коробейникова Л.А., Азимова Ю.Э., Сергеев А.В., Климов Е.А., Табеева Г.Р. Влияние полиморфизма гена *MTHFR* на развитие и особенности течения мигрени с аурой. Сборник тезисов 15^{ой} Пушкинской школы-конференции молодых ученых "Биология – наука XXI века". Пушкино. 18-22 апреля 2011. С.184.