

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

На правах рукописи

Заботина Анна Михайловна

РОЛЬ РЕЦЕПТОРА СЕРОТОНИНА 2А В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССТРОЙСТВ
ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА И ПРОГНОЗЕ
АНТИПСИХОТИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

1.5.4. Биохимия (биологические науки)

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Тараскина Анастасия Евгеньевна

Санкт-Петербург 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Расстройства шизофренического спектра.....	14
1.1.1. Этиология и патогенез	14
1.1.2. Нейрохимические нарушения ЦНС, ассоциированные с развитием шизофрении.....	15
1.1.3. Нейровоспаление в патофизиологии психиатрических заболеваний	16
1.1.4. Микроглиальная активация	17
1.1.5. Периферические маркеры воспаления при психических расстройствах	19
1.2. Антипсихотические препараты	20
1.2.1 Фармакодинамика антипсихотиков	20
1.2.2 Негативные побочные эффекты	23
1.3. Нейро-иммуно-гуморальные взаимодействия в организме человека	24
1.4. Серотонин – моноамин, определяющий биологические функции человека	26
1.4.1 Серотонинергическая нейротрансмиссия ЦНС	27
1.4.2 Роль периферического серотонина	30
1.4.3. Рецепторы серотонина. Строение. Основные классы	32
1.5. Рецептор серотонина 2A	34
1.5.1. Нейромодулирующая функция, роль в патогенезе расстройств шизофренического спектра	34
1.5.2. Структура. Феномен «структурной гибкости» рецептора	37
1.6. Ген <i>HTR2A</i>	39
1.6.1. Структура. Локализация	39

1.7. Альтернативный сплайсинг	40
1.8. Заключение	46
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	48
2.1. Характеристика обследуемых групп. Дизайн исследования	48
2.2. Материал исследования	53
2.3. Методы исследования	53
2.3.1. Выделение лимфоцитов из периферической крови	53
2.3.2. Выделение геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови	53
2.3.3. Выделение РНК. Реакция обратной транскрипции	54
2.3.4. Количественное определение экспрессии гена <i>HTR2A</i>	56
2.3.5. Определение относительного уровня мРНК изоформ транскриптов II экзона гена <i>HTR2A</i>	59
2.3.6. Идентификация генетических вариантов rs6311 и rs6313 гена <i>HTR2A</i> ...	60
2.3.7. Определение количества белка рецептора 5-НТ _{2A}	62
2.3.8. Иммуноферментный анализ концентрации цитокинов IL-6, IL-1 β и TGF-1 β в сыворотке крови	65
2.3.9. Статистическая обработка результатов	70
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	72
3.1. Характеристики рецептора серотонина 2A (5-НТ _{2A}) лимфоцитов периферической крови в норме и при психических патологиях	72
3.1.1. Относительное количество мРНК гена <i>HTR2A</i> и концентрация белка рецептора 5-НТ _{2A} у пациентов с психическими расстройствами и лиц контрольной группы	72
3.1.2. Уровень экспрессии изоформ транскриптов II экзона (E2+, E2-, E2tr) <i>HTR2A</i> в зависимости от психического статуса	74

3.1.3. Распределение генетических вариантов rs6311 и rs6313 гена <i>HTR2A</i> у психически больных и лиц контрольной группы.....	77
3.1.4. Влияние генетических вариантов rs6311(rs6313) <i>HTR2A</i> на характеристики рецептора 5-НТ _{2A} в группах контроля и пациентов с психическими заболеваниями	79
3.2. Изменение показателей рецептора 5-НТ _{2A} (экспрессия мРНК гена <i>HTR2A</i> , мРНК изоформ транскриптов II экзона (E2+, E2-, E2tr) <i>HTR2A</i> , концентрации белка) на фоне антипсихотической терапии у пациентов с психическими расстройствами.....	83
3.2.1. Влияние терапии оланзапином и галоперидолом на относительный уровень экспрессии <i>HTR2A</i> и количество белка 5-НТ _{2A}	83
3.2.2. Относительный уровень мРНК <i>HTR2A</i> и концентрация белка рецептора 5-НТ _{2A} у носителей различных генетических вариантов rs6311(rs6313) <i>HTR2A</i> на фоне антипсихотической терапии	86
3.2.3. Относительный уровень мРНК изоформ транскриптов II экзона <i>HTR2A</i> на фоне антипсихотической терапии.....	88
3.3 Определение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β), активированного TGF- β 1 в сыворотке крови как характеристика системного воспаления при психических заболеваниях	92
3.4 Ассоциация ответа пациентов с психическими расстройствами на терапию с изучаемыми характеристиками рецептора 5-НТ _{2A}	93
3.4.1 Эффективность антипсихотической терапии	93
3.4.2. Развитие побочных эффектов терапии.....	97
ОБСУЖДЕНИЕ	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ.....	115

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	118

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Расстройства шизофренического спектра (РШС) – комплекс психических патологий, связанных с нарушением процессов мышления, восприятия, эмоций и поведения (Brody 2014; Seidman, Mirsky, 2017; Дмитриева, 2012; Revier et al., 2015). РШС возникают преимущественно в позднем подростковом возрасте или в раннем взрослом возрасте (Howes and Murray, 2014), поражают трудоспособные слои населения. Хроническое течение заболевания, уровень инвалидизации до 40%, развитие сопутствующих патологий, а также высокий риск суицида приводят к сокращению продолжительности жизни больных на 10-15 лет по сравнению с общей популяцией (Hjorthoj et al., 2017). РШС являются распространенными психическими расстройствами: по разным оценкам, от данной патологии в мире страдают от 20 до 45 млн. человек, что составляет 0,8-1% глобальной популяции (Дмитриева, 2012; Charlson et al., 2018). Кроме того, по данным консорциума всемирного обследования психического здоровья (WMHSC) большой процент лиц с РШС остается не диагностированным и не получает адекватной терапии (the WHO World Mental Health Survey Consortium, 2010).

РШС требуют обязательной фармакологической терапии, но, несмотря на эволюцию антипсихотических препаратов, около трети пациентов являются резистентными к проводимому лечению или имеют негативные побочные эффекты, что приводит к социальной стигматизации и зачастую к отказу от приема антипсихотиков (Novick et al., 2010; Мосолов, 2012; Howes et al., 2017, Lally et al., 2016). На данный момент нет четких критериев для назначения определенного антипсихотического препарата, а также оценки риска возникновения побочных эффектов терапии при лечении психических расстройств.

Несмотря на углубленное изучение РШС, определение этиопатогенеза психических расстройств отстает от других областей медицины: диагноз строится на поведенческой, симптоматической характеристике пациента. Несмотря на то, что особенности патофизиологии, риск развития и прогноз фармакотерапии РШС – высоконаследуемые признаки: конкордантность монозиготных близнецов может составлять более 60% при наличии дополнительных факторов риска (Pepper et al., 2018), приблизительно только 7% фенотипических особенностей психозов имеет генетически доказанную базу. Независимым подходом к персонализации терапии является определение индивидуального фенотипа, реализованного за счет межиндивидуальных различий в биохимических показателях и экспрессии генов (уровне мРНК) (Lai, et al 2014; Liu, et al., 2013; Cui, et al 2015; Oldmeadow et al., 2014). Кроме этого, важную роль в формировании белка при процессинге мРНК и последующей трансляции отводят альтернативным событиям сплайсинга, имеющим значение для становления функциональных и структурных особенностей белка и развития патологий. В настоящее время одним из перспективных направлений изучения патогенеза психических расстройств являются исследования альтернативного сплайсинга (Gandal et al. 2018).

На данном этапе развития физиологии, психиатрии и молекулярной биологии, психические заболевания, в том числе РШС, рассматривают как системные заболевания с вовлечением в патогенез не только клеток ЦНС (в первую очередь, это дисфункции аминергической нейротрансмиссии), но и периферических органов (иммунной и эндокринной систем): нарушение секреции, метаболизма биогенных аминов в периферических тканях (Bergquist, Silberring, 1998; Pellicano, et al., 2011). В литературе описан «иммунный фенотип» шизофрении (Kroken, et al 2019), характеризующийся изменением субпопуляционного состава лимфоцитов, повышением количества провоспалительных цитокинов, высоким титром аутоантител к клеткам головного мозга. Следует отметить, что модуляция иммунного ответа

и формирование «иммунного фенотипа» опосредованы, в первую очередь, рецепторами биогенных аминов, расположенных на мембране лимфоцитов периферической крови (ЛПК) (McKenna, et al., 2002; Levite, 2016; Tourjman, et al., 2013). Кроме того, фармакологическое действие антипсихотических препаратов не ограничивается воздействием на нейроны ЦНС, а носит системный характер, подавляя работу рецепторов, в том числе-расположенных на иммунных клетках, циркулирующих в кровеносном русле (Singh, et al., 2003). Антипсихотик-индуцированные метаболические нарушения ассоциированы с дисфункцией моноаминергических рецепторов на лимфоцитах периферической крови (ЛПК) и нарушениями метаболизма в периферической жировой ткани (Rojo, et al., 2015). Мы предполагаем, что изучение индивидуальных параметров экспрессии генов рецепторов, участвующих в нейротрансмиссии в лимфоцитах периферической крови, отражающих функциональные показатели физиологического состояния, является актуальным направлением в изучении патогенеза (определении биомаркеров формирования) психических расстройств и прогнозировании успеха антипсихотической терапии.

Рецептор серотонина (5-гидрокситриптамина) 2А (5-НТ_{2А}) – один из основных рецепторов, активируемых серотонином в организме человека, участвующий в патогенезе многих нейропсихических заболеваний и обладающий высоким аффинитетом к антипсихотическим препаратам II поколения. Несмотря на проведение сотен ассоциативных исследований, изучающих вклад вариантов гена *HTR2A* в развитие РШС, роль генетической составляющей *HTR2A* при нейропсихиатрических расстройствах и персонализации терапии остается неясной. Данное исследование оценивает характеристики рецептора 5-НТ_{2А} (уровень мРНК, количество белка, паттерн экспрессии изоформ, генетические варианты *HTR2A*) в ЛПК, в норме и при (РШС, а также при терапии антипсихотическими препаратами I и II генерации: галоперидолом и оланзапином.

Цель исследования: оценить роль рецептора серотонина 2a лимфоцитов периферической крови в патогенезе расстройств шизофренического спектра и прогнозе антипсихотической терапии.

Задачи исследования:

1. Оценить частоту носительства генетических вариантов rs6311, rs6313 *HTR2A*, уровень мРНК *HTR2A*, количество белка 5-НТ_{2A}, паттерн экспрессии изоформ с участием II экзона (E2+, E2-, E2tr) в лимфоцитах периферической крови (ЛПК) у пациентов с расстройствами шизофренического спектра (РШС) и лиц контрольной группы.
2. Оценить изменение экспрессии гена и изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* (E2+, E2-, E2tr) а также количества рецептора 5-НТ_{2A} на фоне 28 дней антипсихотической терапии оланзапином и галоперидолом (препаратами I и II генерации) в ЛПК у пациентов с РШС.
3. Определить концентрацию провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1β) и трансформирующего фактора роста β1 (TGF-β1) в сыворотке крови пациентов с РШС до, а также после 28 дней антипсихотической терапии оланзапином и галоперидолом.
4. Оценить ассоциацию эффективности терапии и развития побочных эффектов под действием галоперидола и оланзапина в течение 28 дней с измеряемыми показателями (носительство генетических вариантов rs6311, rs6313 *HTR2A*, уровень мРНК *HTR2A*, количество белка 5-НТ_{2A}, паттерн экспрессии изоформ с участием II экзона E2+, E2-, E2tr) в ЛПК пациентов с РШС.

Научная новизна

Впервые было проведено исследование, сочетающие в себе две схемы: проспективного лонгитудинального наблюдения пациентов с РШС на фоне

антипсихотической терапии и исследования типа «случай-контроль» с анализом характеристик рецептора 5-HT_{2A} (носительство генетических вариантов *HTR2A* rs6311, rs6313, уровень мРНК, количество белка, паттерн экспрессии изоформ с участием II экзона) в ЛПК. Выбранный дизайн позволил как оценить факторы риска развития психических патологий, формирования негативных побочных эффектов, так и изменение изучаемых показателей рецептора 5-HT_{2A} при фармакотерапии острых психических состояний. Кроме того, преимуществом данной работы является то, что в исследование были включены пациенты с первым психотическим эпизодом, не подвергавшиеся воздействию антипсихотиков ранее, что позволило исключить их влияние на изучаемые параметры рецептора 5-HT_{2A}. Получено первое экспериментальное доказательство, что при терапии оланзапином происходит снижение количества рецепторов 5-HT_{2A} на лимфоцитах периферической крови. Причем, антипсихотические препараты, не зависимо от их фармакодинамики, модулируют транскрипцию и/или трансляцию гена *HTR2A* генотип rs6311 (rs6313) зависимым образом, что влияет на эффективность терапии.

Впервые был охарактеризован профиль изоформ транскриптов II экзона гена *HTR2A* в лимфоцитах крови как периферических биомаркеров развития РШС и эффективности антипсихотической терапии. У пациентов с РШС по сравнению с контрольной группой наблюдался более высокий уровень экспрессии всех изоформ с участием II экзона *HTR2A*, а также изменение паттерна (соотношения) их экспрессии за счет преобладания альтернативных изоформ (E2tr, E2-).

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные данные могут быть использованы для создания панели биохимических маркеров эффективности терапии и оценки риска развития экстрапирамидных побочных эффектов (акатизии, паркинсонизма),

разработки критериев для оценки результатов терапии антипсихотиками, а также, могут лечь в основу назначения терапевтических программ, что, в свою очередь, послужит базисом персонифицированной терапии. Также полученные в ходе работы результаты помогут развитию фундаментальных аспектов биомедицины в области клинической фармакологии, биологической наркологии и психиатрии: будут способствовать раскрытию патогенетических основ возникновения побочных эффектов и терапевтической резистентности при применении антипсихотических препаратов в клинической практике.

Методология и методы исследования

При подготовке и проведении работы была использована стандартная для диссертационного исследования методология: обоснование актуальности темы, определение цели и задач исследования. В процессе решения поставленных задач использовались математико-статистический и аналитический методы. Работа выполнена в сочетании дизайне проспективного лонгитудинального наблюдения психически больных с назначением антипсихотического лекарственного средства путем рандомизации и исследования по типу «случай-контроль» с использованием биохимических, молекулярно-генетических технологий и метода иммуноферментного анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Коморбидное течение расстройств шизофренического спектра с синдромом алкогольной зависимости характеризуется пониженным уровнем экспрессии гена и белка рецептора 5-HT_{2A} в лимфоцитах периферической крови.

2. Пациенты с расстройствами шизофренического спектра и пациенты с коморбидным течением заболевания с синдромом алкогольной зависимости имеют отличный от лиц контрольной группы паттерн экспрессии

транскриптов изоформ II экзона (E2+, E2-, E2tr) гена *HTR2A* за счет преобладания альтернативных изоформ.

3. Снижение количества рецептора 5-HT_{2A} на фоне антипсихотической терапии ассоциировано с аффинностью лекарственного средства, генетическим вариантом GG (CC) rs6311 (rs6313) *HTR2A*, отсутствием побочных эффектов.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности результатов, полученных экспериментально, подтверждается репрезентативным и достаточным объемом выборки наблюдений и контрольных исследований, подтверждена методами статистической обработки данных. Математические методы обработки полученных результатов соответствовали поставленным задачам.

Материалы диссертационного исследования представлены на конференциях и конгрессах:

Международных конгрессах: 29-й – 33-й Конгресс Европейской коллегии нейропсихофармакологии (29th – 33th European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress) – 2016 (Австрия), 2017(Франция), 2018(Испания), 2019(Дания), 2020 (Virtual); XXIV Всемирный конгресс по психиатрической генетике (XXIV World Congress of Psychiatric Genetics) – 2016 (Израиль);

Российских конференциях: XIV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа – 2016 (Москва), IV ежегодный молодежный научный форум Open Science – 2017 (Гатчина, Ленинградская область), 22-ая Международная Пушинская школа-конференция для молодых ученых «Биология-наука XXI века»– 2018 (Пушино), VI Молодежная конференция по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН - 2018 (Санкт-Петербург), V Международная конференция «ПОСТГЕНОМ 2018» - 2018 (Казань), XIX и XXI Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и

молекулярной биологии – 2018 (Рощино, Ленинградская область), 2020 (Репино, Ленинградская область), VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) - 2019 (Санкт-Петербург), V Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» - 2020 (Санкт-Петербург).

Личный вклад автора

Автор лично выполнил основные запланированные молекулярно-генетические и иммунологические исследования по теме диссертации, статистическую обработку данных, полученных в ходе работы, обобщение и оформление результатов. Все полученные данные и выводы данной работы обсуждались с научным руководителем, а также с соавторами данного исследования.

Публикации по материалам исследования

По материалам диссертационного исследования опубликованы 23 научные работы, 4 из них – публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации, а также 2 статьи в зарубежных изданиях, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 142 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение исследования, заключение, выводы, список сокращений и список литературы, включающий 180 научных источников (23 – на русском языке и 157 – на английском). Текст диссертации иллюстрирован 19 таблицами и 31 рисунком.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Расстройства шизофренического спектра

1.1.1. Этиология и патогенез

Шизофрения – тяжелое психическое заболевание, связанное с распадом процессов мышления и деградацией личности. Термин «шизофрения» (от древнегреческого «σχίζω» – «расщеплять» и «φρήν» – «ум») ввел в начале XX в. немецкий психиатр Э. Блейлер, сформулировав правило 4-х «а» изменений личности, характерных для заболевания: **ассоциация, аффект, аутизм и амбивалентность** (Ashok et al., 2012). Болезнь характеризуется сочетанием продуктивной (галлюцинаторно-бредовой, аффективной) и негативной (апатия, абулия, алогия, эмоциональная, социальная отгороженность) симптоматики, поведенческими и когнитивными нарушениями (памяти, внимания, мышления и др.) (Kennedy et al., 2014; Lewis, Buchanan, 2015).

Поскольку с шизофренией ассоциирован комплекс гетерогенных симптомов и возможны различные варианты течения заболевания, под «шизофренией» рассматривают группу психических расстройств, называемых «расстройства шизофренического спектра», объединенных в МКБ-10 рубрикой F20 («Шизофрения кататоническая» F20.2, «Шизофрения параноидная» F20.0, «Острое шизофреноподобное психотическое расстройство» F23.2, «Острое полиморфное психотическое расстройство с симптомами шизофрении» F23.1, и другие). Для диагностики психического статуса пациента используется международный стандарт: шкала позитивных и негативных синдромов PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) (Kay et al., 1987; Ashok et al., 2012).

Хотя шизофрению изучают более ста лет, ее этиология остается неизвестной. Сейчас принята модель «диатез-стресс», предполагающая генетическую предрасположенность к возникновению патологических реакций психики человека при воздействии травмирующих внешних

факторов: как социальных, так и средовых. (Дмитриева, 2012). Комплексное изучение шизофрении показало нарушение процессов, как в головном мозге (структурные изменения, электрохимические нарушения, дисбаланс работы различных систем нейротрансмиссии, дегенеративные изменения белого вещества, активация микро- и астро- глии); так и в периферических органах: специфические нарушения иммунитета, изменение кишечной микрофлоры).

1.1.2. Нейрохимические нарушения ЦНС, ассоциированные с развитием шизофрении

Ключевой характеристикой психических расстройств является функциональный и/или нейроанатомический дисбаланс систем нейротрансмиссии в центральной нервной системе (ЦНС).

Сейчас главенствует «дофаминергическая» теория развития шизофрении, согласно которой, избыток выделения дофамина и/или гиперчувствительность дофаминовых рецепторов лежит в основе патогенеза заболевания. Показана корреляция между степенью блокировки рецепторов дофамина D₂, дозой антипсихотика, редукцией симптомов заболевания и развитием побочных эффектов. Однако данная теория не может дать полного ответа на все вопросы, связанные с патогенезом шизофрении, например, объяснить резистентность к терапии типичными антипсихотиками у некоторых пациентов (Lewis, Buchanan, 2015).

По современным представлениям, гиперактивация дофаминовой нейротрансмиссии в мезолимбических областях головного мозга ассоциирована с позитивной симптоматикой заболевания, тогда как недостаточная дофаминергическая нейротрансмиссия в префронтальной коре головного мозга (мезокортикальный путь) ведет к появлению негативных симптомов (Pogarell et al., 2012; Da Silva Alves et al., 2008). Существуют три основных нейронных пути, взаимовлияющих друг на друга, ассоциированных с развитием продуктивных симптомов шизофрении: дофаминовый,

серотониновый, глутаматный. Дисбаланс нейротрансмиттеров серотонина и глутамата за счет изменения активности рецепторов: гипоактивности N-метил-D-аспарата ГАМКергических интернейронов коры головного мозга и гиперактивности 5HT-_{2A} на глутаматных нейронах приводит к гиперактивности дофаминергической нейротрансмиссии по мезолимбическому пути.

Нарушение глутаматергической активности может быть вовлечено в патофизиологию не только позитивных, но и негативных симптомов и когнитивных нарушений. Доминирующая гипотеза проявления негативных симптомов – кинурениновая, согласно которой в головном мозге возникает дисбаланс метаболитов триптофана по кинурениновому пути: нейродегенеративных хинолинов и нейропротективных кинуренинов, (Шилов, Безруков, 2013). В основе когнитивных нарушений при шизофрении также рассматривают дисбаланс холинергической и ГАМКергической нейротрансмиссии (Lewis, Buchanan, 2015).

1.1.3. Нейровоспаление в патофизиологии психиатрических заболеваний

В настоящее время представление о заболеваниях мозга редко ограничиваются только ментальными симптомами. Возможные ассоциации между шизофренией и иммунной системой были постулированы более века назад и поддерживаются по настоящее время как генетическими, так и эпидемиологическими исследованиями, указывающими на связь психических патологий с инфекциями и воспалением. Вопреки традиционному взгляду, что мозг является «иммунологически привилегированным органом», защищенным гематоэнцефалическим барьером, исследования последних 20 лет показали взаимодействия между иммунной системой, воспалением и ЦНС. Показано, что воспалительные процессы могут приводить к изменению настроения, когнитивных функций, поведения (Khandaker et al., 2015; Najjar & Pearlman, 2015; Reus et al., 2015; Kroken et al., 2019).

1.1.4. Микроглиальная активация

Показано, что психические патологии, в том числе и шизофрения, ассоциированы с определенными воспалительными процессами как в ЦНС, так и за ее пределами. Для определения воспаления нервной системы, возникающего у психически больных и обычно ассоциированного с активацией микроглии, был предложен термин «нейровоспаление» (Najjar et al., 2013).

Микроглия – специализированный класс глиальных клеток ЦНС, выполняющих защитные функции: распознавание патогена, фагоцитоз, презентация антигена, ремоделирование синапсов и др. В нормальных условиях микроглия не активирована, принимает участие в гомеостазе, репарации поврежденных клеток, но не фагоцитирует, высвобождая минимальное количество физиологически активных молекул. При поступлении сигналов воспаления или повреждения происходит пролиферация микроглии и ее активация. Активаторы микроглии: пуриnergический рецептор P2X7, молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями клетки (DAMPs): АТФ, белок S-100, гистоны, белки теплового шока (HSP) (Perry et al., 2010; Reus et al., 2015).

Выделяют два типа активированной микроглии: классический M1 и альтернативный M2. M1 активация отличается антиген-презентирующей способностью, усиленным синтезом провоспалительных цитокинов (IL-1- β , IL-6, TNF- α), супероксидных радикалов, глутамата, направлена на уничтожение инфекционных агентов, опухолевых клеток и восстановление тканей. M2 активация участвует в ремоделировании тканей, их репарации, инициации ангиогенеза, очистке от клеточного детрита, оказывает противовоспалительный эффект за счет продукции противовоспалительных цитокинов (интерлейкинов IL-3, IL-4, IL-10), TGF- β , глюкокортикостероидов и нейротрофных факторов (Reus et al., 2015; Khandaker et al., 2015).

Чрезмерная активация микроглии вызывает патологические изменения в ЦНС: при выделении избытков глутамата, действующего на NMDA-рецепторы, может происходить повреждение нейронов (явление эксайтотоксичности), при гиперсинтезе IL1- β – демиелинизация аксонов. В настоящее время доказано, что когнитивные и поведенческие изменения, наблюдаемые при психических расстройствах, сопровождаются изменениями в количестве или морфологии микроглиальных клеток. Несмотря на то, что активация микроглии является типичным признаком патологии головного мозга, степень ее влияния на развитие психических патологий до конца не изучена.

Микроглиальная гипотеза развития шизофрении заключается в следующем: провоспалительные цитокины и различные DAMPs инициируют активацию микроглиальных клеток по типам M1 и M2, что, в свою очередь, может привести к синтезу как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Белок S-100 совместно с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE), а также активация M1 может вызывать атрофию астроцитов и приводить к апоптозу нервной ткани, а также увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов. При этом, антипсихотические препараты снижают уровень циркулирующих цитокинов и активных форм кислорода (Reus et al., 2015).

Активированная ранее микроглия может впоследствии сильнее реагировать на новые стимулы, вероятно, поскольку сохраняет память о патологии, увеличивая ответ на новое системное воспаление (Doorduyn et al., 2009). Тяжелые воспалительные заболевания, инфекции ЦНС, перенесенные в детстве, могут оказывать влияние на микроглию, усиливая ее способность к активации и увеличивая риск возникновения психоза после последующих инфекций (Brown, 2011; Khandaker, Zimbron, 2012; Khandaker et al., 2015).

Ингибирование провоспалительных цитокинов или усиление синтеза противовоспалительных медиаторов может быть одной из перспективных

стратегий терапии психически больных. Предполагается, что ингибирование активности DAMPs или воздействие противовоспалительных агентов может приводить к редукции симптомов шизофрении.

1.1.5. Периферические маркеры воспаления при психических расстройствах

Было доказано наличие периферических маркеров воспаления при психических расстройствах, участвующих как во врожденном иммунном ответе (дисбаланс цитокинов), так и в адаптивном (нарушения субпопуляционного состава лимфоцитов, повышенный титр аутоантител). Корреляция симптомов психических патологий с иммунными показателями была показана не только у людей, но и на животных моделях. Фенотип иммунных клеток, ассоциированный с расстройствами шизофренического спектра, характеризует достоверное увеличение процента всех Т-лимфоцитов (CD3), а также популяций CD4 (Т-хелперов) и CD56 (натуральных киллеров) и соотношения CD4/CD8 (Т-хелперов к эффекторным клеткам) (Kroken et. al., 2019). Первый психотический эпизод отличает преимущественная дифференциация Т-хелперов (Th) по 17 типу, причем количество Th17 коррелирует с общим баллом по шкале PANSS (с выраженностью симптомов заболевания), и достоверно снижается при антипсихотической терапии и редукции симптоматики (Ding et. al., 2014).

Существует ряд гипотез развития шизофрении, в основе которых лежит перестройка цитокинового профиля. В начале 90-х годов XX века Смит и Маес предложили «макрофагально-Т-лимфоцитарную» теорию, которая постулирует, что хронически активированные макрофаги и Т-лимфоциты продуцируют IL1-β, IL-2, TNF-α, интерферон INF-α и INF-γ –основные медиаторы, повышение которых наблюдается при шизофрении (Smith, Maes, 1995). Независимо от них, Шварц предложил «Th2» гипотезу, утверждающую, что при шизофрении преобладает сдвиг от Th1-клеточной (цитотоксической)

функции к Th2-клеточным (антителозависимым) иммунным ответам (Schwarz et al., 2001).

Позже была сформулирована микроглиальная теория, в основе которой лежит гиперпродукция провоспалительных цитокинов глиальными клетками (Monji et al., 2009). При этом периферические цитокины могут дополнительно воздействовать на микроглию по двум путям: нейронному – активация цитокинами блуждающего нерва с последующей передачей сигнала путем ретроградного транспорта по аксону; и гуморальному – проникновение цитокинов через гематоэнцефалический барьер по градиенту концентрации (Khandaker et. al., 2015).

По результатам мета-анализов, повышенный уровень плазменных цитокинов, таких как IL-12, IFN- γ , TNF- α и sIL-2R, рассматривают как биомаркеры психических девиаций, причем их концентрация повышена как в актуальном психическом состоянии, так и после антипсихотической терапии. При этом уровни IL-1- β , IL-6 и TGF- β признаны маркерами острой фазы заболевания, поскольку их показатели при проведении фармакотерапии снижались до нормального уровня (Tourjman et al., 2015; Kroken et al., 2019; Capuzzi et al., 2017).

При психических патологиях наблюдается наличие в плазме и/или спинномозговой жидкости титра аутоантител к кардиолипину и рецептору N-метил-D-аспарата (Ezeoke et. al., 2013). Но повышение этих показателей также наблюдается при антифосфолипидном синдроме и энцефалите (Kroken et al., 2019).

1.2. Антипсихотические препараты

1.2.1 Фармакодинамика антипсихотиков

Лечение расстройств шизофренического спектра предполагает обязательный прием антипсихотиков (Gaebel, 2011). Механизм действия антипсихотиков заключается в коррекции уровня моноаминов в организме

человека путем блокировки работы их рецепторов, лигандами для которых они являются (Фармакологический справочник «Видаль», Электронный ресурс).

В настоящее время существует около 50 различных антипсихотиков, различающихся по своему аффинитету и профилю связывания с рецепторами нейротрансмиссии. Антагонизм антипсихотиков к рецепторам выражают в константе ингибирования K_i , которая отражает концентрацию лекарственного средства, необходимую для связывания 50% рецепторов, то есть K_i – индикатор аффинности (Kaar et al., 2020). На современном рынке выделяют два основных класса антипсихотических препаратов: первого поколения (типичные) и второго поколения (атипичные).

Антипсихотики I поколения

Характерной чертой типичных антипсихотиков является антагонизм преимущественно к D₂-подобным рецепторам дофамина. Считается, что антипсихотики I поколения лучше снимают позитивные симптомы шизофрении и купируют острые состояния (Kaar et al., 2020), опосредованные гиперактивацией дофаминергических нейронов в мезолимбическом пути головного мозга. Одним из самых часто назначаемых препаратов I поколения является галоперидол (бутирофенон), рисунок 1.1.

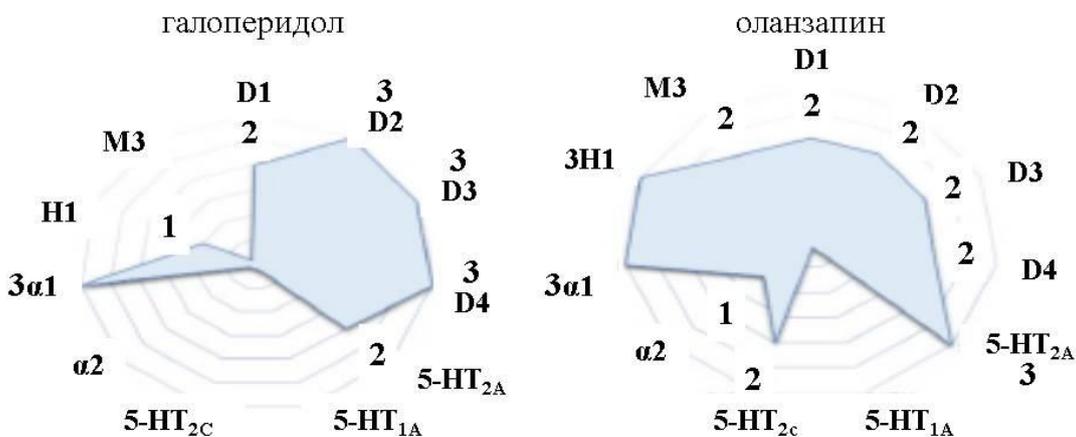


Рисунок 1.1 – Сравнение аффинности галоперидола и оланзапина

Числа на концентрических линиях представляют аффинитет лекарственного средства (K_i) к рецепторам моноаминов, где 3 – высокая аффинность (K_i 1-10), 2 – умеренная (K_i 10-100), 1 – низкая (K_i 100-1000). По данным программы скрининга психоактивных средств (PDSP) Национального института психического здоровья (<https://pdsp.unc.edu/databases/kidb.php>)

Антипсихотики II поколения

Атипичные антипсихотики были изобретены в попытке уменьшить побочные эффекты, вызываемые препаратами I генерации. Помимо связывания с различными типами дофаминовых рецепторов (с меньшей константой связывания), они обладают аффинностью к рецепторам серотонина 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, адреналина, гистамина. Антипсихотики II поколения назначаются при превалировании негативных симптомов шизофрении, поскольку снижают избыточную активность серотонинергических нейронов (приводящую к активации дофаминергических нейронов в мезокортикальном пути) и уменьшению негативных симптомов шизофрении (Lewis, Buchanan, 2015).

В 1990-х годах был получен препарат оланзапин (Schulz et. al., 2013), имеющий большее сродство к рецептору серотонина 5-HT_{2A}, гистамина (H1) и адренергическому рецептору (α_1) (рисунок 1.1). Оланзапин применяется в лечении многих психических расстройств, широко используется для купирования острых психозов, разрешен для детей и подростков. За последние десять лет произошел экспоненциальный рост его назначения.

Препаратами выбора при терапии первого психотического эпизода являются галоперидол и оланзапин за счет их высокой эффективности и относительной безопасности. Однако в настоящее время не существует верифицированной стратегии назначения препаратов.

Антипсихотические препараты обладают системным действием на организм. Показано, что антипсихотические препараты оказывают

противовоспалительное действие, связанное с улучшением общего психического состояния, при этом развитие негативных побочных эффектов терапии ассоциировано с воспалительными процессами, а также увеличением концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови и запуском аутоиммунных нарушений (Miller et. al., 2011; Tourjman et. al., 2013).

1.2.2 Негативные побочные эффекты

Терапия антипсихотиками может сопровождаться рядом нежелательных явлений, ухудшая качество жизни, и являться причиной отказа от лечения.

Самым распространенным побочным эффектом при приеме типичных антипсихотиков являются двигательные нарушения (экстрапирамидные симптомы): паркинсонизм, акатизия, поздняя дискинезия (Голубев, 2002; Lewis, Buchanan, 2015). Паркинсонизм (дрожание конечностей, мышечная ригидность) и акатизия (непроизвольные неконтролируемые движения) считается следствием блокады дофаминергических нейронов в nigrostriальном пути, хотя механизм развития патологии точно не известен. Поздняя дискинезия – насильственные, непроизвольные движения, в основе которых, предположительно, лежит компенсаторное увеличение числа и развитие гиперчувствительности D1-рецепторов в стриатуме вследствие продолжительной их блокады (Федорова, 2006).

Широкий спектр связывания атипичных антипсихотиков определяет уменьшение риска развития экстрапирамидных симптомов, но зачастую приводит к возникновению гормональных и метаболических осложнений: набору веса, гиперпролактинемии, нарушению липидного обмена, диабету 2 типа, нарушению сна, заторможенности, гранулематозу (клозапин) (Kaag et. al., 2020).

Оланзапин, в сравнении с галоперидолом, при одинаковых суточных дозах показывал лучшие результаты по шкале общих психопатологических синдромов, но при этом нарушение баланса нейропептидов в гипоталамусе,

отвечающих за мотивацию и подкрепление при приеме пищи, а также воздействие на жировую ткань способствуют увеличению массы тела (Balt et al., 2011; Bhana et al., 2001).

Персонализация фармакотерапии психических расстройств является одной из самых актуальных областей психиатрии (Мосолов, 2012). Несмотря на постоянное совершенствование формулы нейрорептиков, повышение безопасности и снижение количества нежелательных явлений терапии психических заболеваний остается насущной проблемой. Ведутся активные исследования по поиску биомаркеров, на основе которых возможно будет подбирать терапию индивидуально для каждого пациента с максимальной эффективностью и минимальными побочными эффектами (Насырова, 2015; Иванов, 2012).

1.3. Нейро-иммуно-гуморальные взаимодействия в организме человека

Нервная, иммунная и эндокринная системы тесно сообщаются друг с другом на различных уровнях. Взаимодействия этих систем обусловлены представленностью пептидергических и аминергических нейронов, иммунокомпетентных клеток и апудоцитов в каждом висцеральном органе и происходят за счет частично общего рецепторного аппарата и медиаторов: нейропептидов, нейротрансмиттеров, гормонов и цитокинов. Цитокины оказывают воздействие на функционирование моноаминергических систем, при этом нейромедиаторы регулируют секрецию различных цитокинов путем стимуляции соответствующих иммунокомпетентных клеток (Лычкова, Пузиков, 2014; Consentino et al., 2007; Ferreira, et al., 2011; Pacheco et al., 2014; Levite, 2016).

Центральная ось регуляции нейро-иммуно-гуморальных взаимодействий – гипоталамо-гипофизарная система, включающая эндокринную ось: гипоталамус – гипофиз – периферические железы (надпочечники, щитовидная железа, семенники или яичники) и вегетативную

нервную систему: гипоталамус – вегетативные центры ЦНС – вегетативные ганглии – эндокринные железы и их сосуды. Проекция дофаминергических, серотонинергических, адренергических нейронов ЦНС так же, как и нейроны вегетативной нервной системы, подают сигналы в гипоталамус, который, в свою очередь, посредством нейрогормонов передает сигналы в гипофиз, что приводит к выработке различных гормонов. Гипоталамо-гипофизарная система включает в себя гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую (ГГН), гипоталамо-гипофизарно-тиреоидную (ГГТ) и гипоталамо-гипофизарно-гонадальную (ГГГ) системы. Основными эффекторами ГГН системы являются глюкокортикоиды кортизон и гидрокортизон, выделяемые корой надпочечников. Действие этих молекул регулирует широкий спектр функций иммунной системы, включая миграцию, созревание, дифференцировку иммунных клеток. Активация данной оси играет важную роль в развитии аутоиммунных заболеваний, воспалении, аллергии. При хроническом стрессе происходит длительная активация ГГН оси, что приводит к подавлению иммунитета. Краткосрочное же повышение глюкокортикоидов в крови при стрессе, наоборот, приводит к усилению иммунного ответа. Повышение глюкокортикоидов смещает баланс (Th1/Th2) –хелперов, усиливая продукцию Th2 цитокинов (гуморальный иммунитет) и ингибируя Th1 (клеточный иммунитет). Глюкокортикоиды имеют рецепторы для связывания на многих клетках организма, и действуют, как влияя на метаболизм клеток (быстрый эффект), так и изменяя экспрессию генов провоспалительных цитокинов, хемоаттрактантов и других молекул (долгосрочный эффект). При этом баланс производства цитокинов смещается в сторону противовоспалительных. Хотя действие гормонов считается противовоспалительным, было показано иммуномодулирующее, дозозависимое действие при физиологических концентрациях. Синтетические аналоги глюкокортикоидов широко используются в лечении аутоиммунных заболеваний, аллергии, хотя обладают большим количеством побочных эффектов.

Таким образом, можно говорить о нервной, иммунной и эндокринной системах как о единой регуляторной системе организма, направленной на поддержание гомеостаза в условиях инфекций, механических повреждений, психоэмоциональных перегрузок (стресса), объясняя феномен взаимосвязи психического состояния, нервной деятельности и иммунного статуса человека.

1.4. Серотонин – моноамин, определяющий биологические функции человека

Серотонин [5-гидрокситриптамин (5-Hydroxytryptamine, 5-НТ)] – биогенный моноамин, сходный с эпинефрином (адреналином), норадреналином, дофамином и гистамином, одно из ключевых соединений, участвующих в поддержании гомеостаза организма, а также являющийся нейромедиатором, участвующим в реализации когнитивных функций человека.

Несмотря на то, что в настоящее время основную функцию серотонина связывают с деятельностью ЦНС, большая часть его в организме человека вырабатывается в желудочно-кишечном тракте (Mohammad-Zadeh et al., 2008; McCorvy & Roth, 2015).

На периферии серотонин участвует в физиологии желудочно-кишечного тракта, остановке кровотечений, поддержании тонуса сосудов, модуляции иммунного ответа (Herr et al., 2013; Mittal et al., 2017), в ЦНС – это нейротрансмиттер определяющий когнитивные функции, поддержание биоритмов, метаболизм нейроглии (Hensler et al., 2013; Kraus et al., 2017). Широкой спектр выполняемых функций в организме человека определяет ключевую роль серотонина в патофизиологии как психических (депрессия, шизофрения, биполярное аффективное расстройство, различные зависимости), так и неврологических, сердечно-сосудистых патологий, заболеваний желудочно-кишечного тракта, астмы, атопического дерматита.

Единственным субстратом для синтеза серотонина в организме человека является незаменимая аминокислота триптофан. Метоксииндольной путь катаболизма триптофана, определяющий биосинтез серотонина, запускается ферментом триптофан 5-гидроксилазой, которая переводит аминокислоту в 5-гидрокситриптофан, с последующей декарбоксилизацией в 5-гидрокситриптамин. По различным оценкам только 1-5% триптофана конвертируется в серотонин, в то время как приблизительно 95% метаболизируется по альтернативному биохимическому пути - кинурениновому (Mohammad-Zadeh et al., 2008; Шилов, Безруков, 2013).

99% серотонина в организме находится внутриклеточно. Концентрация серотонина в тканях зависит не только от скорости синтеза, но и от скорости его деградации. Фермент, инициирующий распад серотонина, как и других биогенных аминов, – моноаминоксидаза (МАО). МАО экспрессируется в клетках головного мозга, желудочно-кишечного тракта, легких, печени и тромбоцитах. Основным дериватом серотонина, опосредованным МАО, является 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-НИАА), которая выводится из организма преимущественно с мочой (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

1.4.1 Серотонинергическая нейротрансмиссия ЦНС

В ЦНС серотонин синтезируется и хранится в пресинаптических нейронах: серотонинергических, катехоламинергических и нейронах шишковидной железы (эпифиза). При деполяризации нейронов серотонин выделяется в синаптическую щель, где связывается с постсинаптическими пресинаптическими серотониновыми рецепторами. За обратный транспорт нейромедиатора отвечает транспортер серотонина (SERT), расположенный на пресинаптической мембране нейрона. При обратном захвате серотонина пресинаптическим нейроном он возвращается в везикулы, становясь, таким образом, интактным. Деградация серотонина МАО происходит в цитозоле нейрона. Альтернативный путь метаболизма нейромедиатора в мелатонин происходит в нейронах эпифиза. Ядра шва (скопления нейронов,

расположенных по средней линии продолговатого мозга) представляют собой основные скопления клеточных тел с восходящими серотонинергическими волокнами, простирающимися на передний мозг, и с нисходящими, с проекциями в продолговатый и спинной мозг. Небольшое количество серотонинергических ядер также присутствует в волокнах ретикулярной формации в пределах продолговатого мозга (Mohammad-Zadeh et al., 2008; Бохан и соавт., 2013; Loonen & Ivanova, 2016). Выделяют семь каскадов серотонинергических нейронов, простирающихся от ствола головного мозга (рисунок 1.2) (Бохан и соавт., 2013; Loonen & Ivanova, 2016). Поскольку дендриты 5HT- нейронов имеют множественные проекции по всему головному и спинному мозгу, серотонин влияет на многие как когнитивные, так и вегетативные функции организма, задействован почти в каждой физиологической функции организма. Серотонин участвует в регуляции таких функций как внимание, сон, моторика, аппетит, эмоции, рвота, тошнота, поддержание гормонального уровня, температура тела, сексуальное поведение, боль, сенсорика, нейропластичность. Была показана роль данного моноамина в возникновении аффекта, страхов, галлюцинаций. В общем, эта система оказывает эффекты, противоположные адренергической системе: там, где активируется секреция норадреналина, уменьшается активность серотонина.

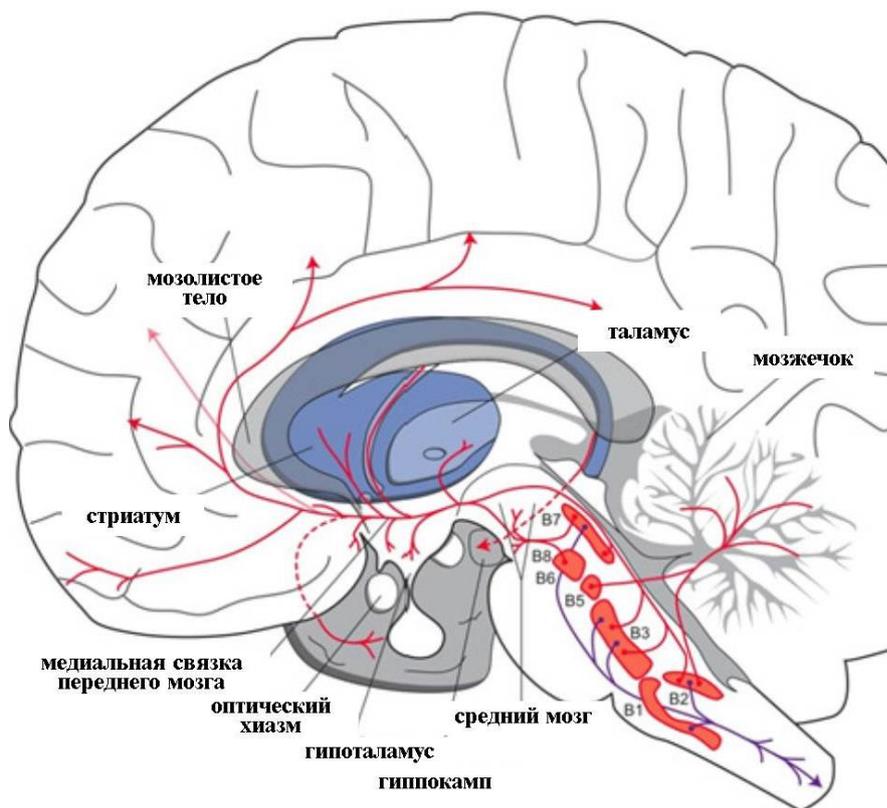


Рисунок 1.2 – Серотонинергические проекции из ростральных и каудальных ядерных зон продолговатого мозга на другие структуры ЦНС, по Loonen & Ivanova, 2016. Клеточные группы ядер: В1 – бледное ядро шва; В2 – темное ядро шва; В3 – большое ядро шва; В5 – мостовое ядро шва; В7 – дорсальное ядро шва; В6 и В8 – верхнее центральное ядро шва; В4 и В9 – отсутствуют конкретные анатомические структуры

5-НТ нейроны играют важную роль в регуляции мозгового кровообращения, имеют ингибирующее влияние на locus coeruleus и вентотегментальную область, являющиеся важнейшими дофаминергическими и адренергическими ядрами. Кроме того, 5-НТ система вовлечена в регуляцию болевой перцепции, соматосенсорной и нейромышечной дуг рефлексов (Бохан и соавт, 2013).

1.4.2 Роль периферического серотонина

Около 90-95% серотонина в организме находится на периферии. Большая часть этого нейротрансмиттера (гормона) образуется с участием триптофан 5-гидроксилазы 1 (ТРН1) в энтерохромаффинных клетках кишечника, влияя на его моторику. Затем из клеток кишечника серотонин секретируется в кровоток, где его захватывают циркулирующие тромбоциты – основной резервуар серотонина вне пределов ЦНС. Тромбоциты переносят 5-НТ в гранулах в высоких концентрациях (до 65 мМ) и выделяют его в просвет сосуда при активации, инициируя вовлечение новых клеток, местную вазоконстрикцию, способствуя уменьшению кровотока, образованию тромба и остановке кровотечения. Концентрация серотонина в плазме в состоянии покоя около 10 нМ, при активации – 10 мкМ и более (Herr et al., 2017).

Кроме того, периферический серотонин участвует в росте клеток печени, костной ткани, легких, артерий, развитии сердца и молочной железы, в регуляции частоты сердечных сокращений, в поддержании тонуса сосудов, обладая также иммуномодулирующей функцией. Выделившийся серотонин при активации тромбоцитов могут захватывать клетки иммунной системы, накапливая его в гранулах хранения, предъявляя другим иммунным клеткам, способствуя пролиферации, активации последних и синтезу пула цитокинов (Ahern, 2011; Arreola et. al., 2015). Таким образом, в кровяном русле серотонин является сигнальной молекулой, передаваемой от клетки к клетке при возникновении сбоя (повреждение клеток, проникновение чужеродных 2017), рисунок 1.3. Известно, что и периферический (тромбоцитарный) и центральный (нейрональный) серотонин может модулировать иммунный ответ организма. Изначально обсуждалась возможность серотонинергической регуляции иммунных процессов через вегетативную нервную систему: 5-НТ, накопленный в адренергических терминалях первичных и вторичных лимфоидных органов, при стимуляции симпатических нервов

высвобождается, активируя рецепторы серотонина на иммунных клетках (Лычкова, Пузиков, 2014).

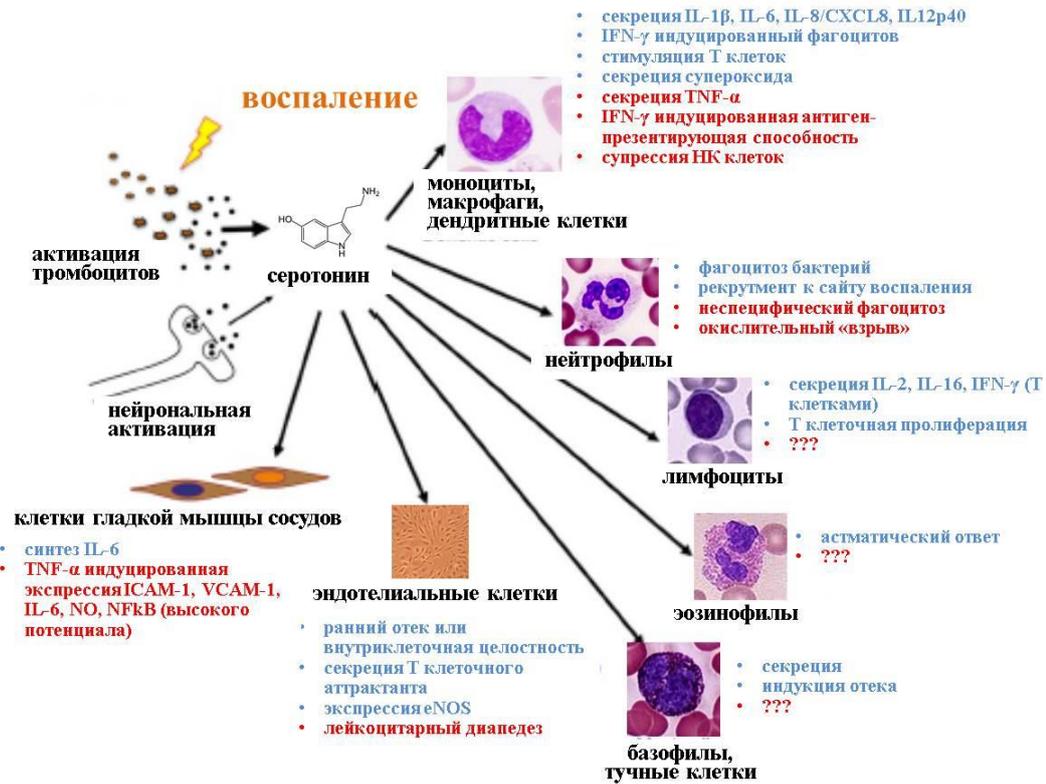


Рисунок 1.3 – Комплекс функций периферического серотонина при воспалении и иммунном ответе по Herr с соавторами (Herr et al., 2017)

Также доказательством стимуляции периферических органов и тканей 5-HT ЦНС послужила выведенная линия мышей с нокаутом гена *TRH1*, лишенная способности синтезировать серотонин в периферических органах, но при этом экспериментальные животные были жизнеспособны и имели достаточный иммунный ответ (Ahern G.P., 2011). Однако согласно современным представлениям, модулирующее действие, направленное на циркулирующие иммунные клетки, оказывает в основном—периферически синтезированный серотонин (Herr et al., 2017).

1.4.3. Рецепторы серотонина. Строение. Основные классы

Физиологические эффекты серотонина у человека опосредованы семью типами (14 подтипами) рецепторов: 5-НТ1 (5-НТ_{1А}, 5-НТ_{1В}, 5-НТ_{1D}, 5-НТ_{1Е}, 5-НТ_{1F}), 5-НТ2 (5-НТ_{2А}, 5-НТ_{2В}, 5-НТ_{2С}), 5-НТ3, 5-НТ4, 5-НТ5 (5-НТ_{5А}, 5-НТ_{5В}), 5-НТ6, 5-НТ7, (Таблица 1.1), представленных как на нейронах ЦНС, так и на периферических иммунных клетках.

Таблица 1.1 – Характеристика 5-НТ рецепторов и транспортера серотонина человека по Meredith et al., 2005.

	5-НТ _{1А}	5-НТ _{1В}	5-НТ _{1D}	5-НТ _{1Е}	5-НТ _{1F}
Количество доменов белка	7	7	7	7	7
Трансдукция	G _{i/o}				
Селективный агонист	8-ОН-DPAT	нет	нет	нет	LY334370
Селективный антагонист	WAY100635	SB236057	BRL15572	нет	нет
	5-НТ _{2А}	5-НТ _{2В}	5-НТ _{2С}	5-НТ3	5-НТ4
Количество доменов белка	7	7	7	7	7
Трансдукция	G _{q/11}	G _{q/11}	G _{q/11}	Ионный канал	G _s
Селективный агонист	нет	нет	нет	нет	BIMU8
Селективный антагонист	MDL100907	нет	SB242084	Ondansetron	SB204070
	5-НТ _{5А}	5-НТ _{5В}	5-НТ6	5-НТ7	5-НТТ
Количество доменов белка	7	7	7	7	12
Трансдукция	Не известно	Не известно	G _s	G _s	транспорт
Селективный агонист	нет	нет	нет	нет	5-НТ
Селективный антагонист	нет	нет	SB271046	SB656104	Paroxetine

Все 5-НТ рецепторы являются 7-трансмембранными G-белок-связанными рецепторами (G protein-coupled receptor (GPCR)), за исключением 5-НТ3, который является лиганд-управляемым катионным каналом,

аналогичным по структуре рецепторам ГАМК и N-метил-D-аспарата (Mohammad-Zadeh et al., 2008; McCorvy & Roth, 2015). $G\alpha$ -субъединицы 5-HT рецепторов принадлежат к трем каноническим классам $G\alpha_i$ (которые ингибируют аденилатциклазу и открывают калиевые каналы), $G\alpha_q/11$ (активируют фосфолипазу C) и $G\alpha_s$ (активируют аденилатциклазу), тем самым позволяя этому семейству рецепторов модулировать несколько биохимических путей и приводить к различным физиологическим последствиям (Meredith et al., 2005; Mohammad-Zadeh et al., 2008; McCorvy & Roth, 2015; Rodrigo et al., 2019). В дополнение к канонической передаче сигналов G-белка, было также обнаружено, что GPCR участвуют в альтернативном сигнальном пути с вовлечением гликогенсинтазы киназы 3-бета (GSK-3b) и β -аррестина. Фосфорилирование активированного GPCR, опосредованное GSK-3b, инициирует связывание рецептора с β -аррестинами, что в конечном итоге приводит к десенсibilизации рецептора и его интернализации в эндосому (McCorvy & Roth, 2015; Wang et al., 2017).

В настоящее время доказано, что десенсibilизация и последующая интернализация GPCR имеет клиническое значение, влияя на терапевтический эффект фармакологических препаратов, аффинных к рецепторам, сопряженным с G-белками, а также на развитие негативных побочных эффектов.

Показано, что GPCR на поверхности мембраны эффекторных клеток формируют гомодимеры, олигомеры и гетеродимеры, что усложняет интерпретацию их взаимодействия с лигандами (агонистами, антагонистами), а также их функциональную активность (Millan et al., 2008; Rivera-Baltanas et al., 2014; Frederick et al., 2015; Agnati et al., 2016).

1.5. Рецептор серотонина 2A

1.5.1. Нейромодулирующая функция, роль в патогенезе расстройств шизофренического спектра

Рецептор серотонина 2A (5-HT_{2A}) широко представлен в различных отделах головного мозга (рисунок 1.4) и периферических тканях (García-Bea et al., 2019; Nichols & Nichols, 2008). В ЦНС рецептор 5-HT_{2A} преимущественно экспрессируется во внешних отделах коры полушарий (неокортексе): в префронтальной, теменной, соматосенсорной коре и в обонятельном бугорке. Наибольшее количество этого рецептора находится в апикальных дендритах пирамидальных клеток слоя коры, ответственного за мыслительные процессы, рабочую память и внимание.



Рисунок 1.4 – Распределение рецептора 5-HT_{2A} в головном мозге (Ebdrup et al., 2011) А - позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) усредненного потенциала связывания рецептора серотонина 5-HT_{2A} в 30 здоровых образцах мозга; Б – экспрессия рецептора 5-HT_{2A} в различных отделах головного мозга (Guiard & Giovanni, 2015)

В периферических органах рецептор 5-HT_{2A} широко представлен в сердечно-сосудистой системе, тромбоцитах, фибробластах, на поверхности адипоцитов, нейронах периферической нервной системы. Он участвует в моторике кишечника, обнаружен на стенках мочевого пузыря, иммунных клетках (В- и Т-лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках).

Поскольку рецептор 5-НТ_{2А} локализован в областях мозга, которые опосредуют когнитивные, поведенческие реакции, его рассматривают как одно из звеньев патогенеза различных патологий, затрагивающих эти функции: шизофрения, обсессивно-компульсивное расстройство, депрессия, нервная анорексия, синдром дефицита внимания и гиперактивности, расстройства аутистического спектра (Raote et al., 2007; Aznar & Hervig, 2016).

Ниже перечислены факты, доказывающие участие 5-НТ_{2А} в развитии расстройств шизофренического спектра:

1. Действие галлюциногенных препаратов, таких как псилоцибин или диэтиламид лизергиновой кислоты (ЛСД), опосредованное активацией рецепторов 5-НТ_{2А}, у здоровых людей провоцирует психические состояния, сходные с шизофренией (Carhart-Harris et al., 2016; Preller et al., 2018);
2. У мышей, нокаутных по гену *HTR2A*, не наблюдалось эффекта воздействия серотонинергических психоделиков (Gonzales-Maeso et al., 2007);
3. Доказана роль генетических вариантов *HTR2A* в развитии сенсомоторного дефицита стробирования (фильтрации избыточных импульсов), ассоциированного с шизофренией (Geyer & Vollenweider, 2008);
4. Описаны различия метилирования гена *HTR2A* в головном мозге пациентов с шизофренией по сравнению с лицами без психических патологий (Cheah et al., 2017);

При развитии состояний подобных шизофрении на модельных животных (спровоцированных нарушением иммунологических, генетических параметров, фармакологическим воздействием и адаптационным отбором) показано повышение экспрессии и/или передачи сигнала рецептора 5-НТ_{2А} (Dean et al., 2008; Fomsgaard et al., 2018; Malkova et al., 2014).

Ключевая роль рецептора 5-HT_{2A} – участие в основной функции серотонина как нейротрансмиттера – нейромодуляции (Deurwaerdere & Giovanni, 2017; Soman et al., 2020).

Нейроанатомия головного мозга показывает структурные и функциональные связи между компонентами моноаминергической нейротрансмиссии - комплексную сеть взаимосвязанной иннервации (Giovanni et al., 2008; Hensler et al., 2013). Дофаминергические нейроны иннервируются серотонинергическими нейронами из ядер шва ствола мозга. Помимо прямого воздействия на серотониновые рецепторы на дофаминергических нейронах, серотонин модулирует дофаминергическую нейротрансмиссию через ГАМК и глутаматные интернейроны в этих областях, рисунок 1.5. Стимулируя эти интернейроны через 5-HT_{2A} рецепторы, серотонин модулирует выделение дофамина дофаминергическими нейронами в среднем мозге (черная субстанция и VTA) и в префронтальной коре головного мозга (PFC) (лобных долях коры больших полушарий) (Stahl, 2008; Loonen & Ivanova, 2016; Deurwaerdere & Giovanni, 2017; Soman et al., 2020).

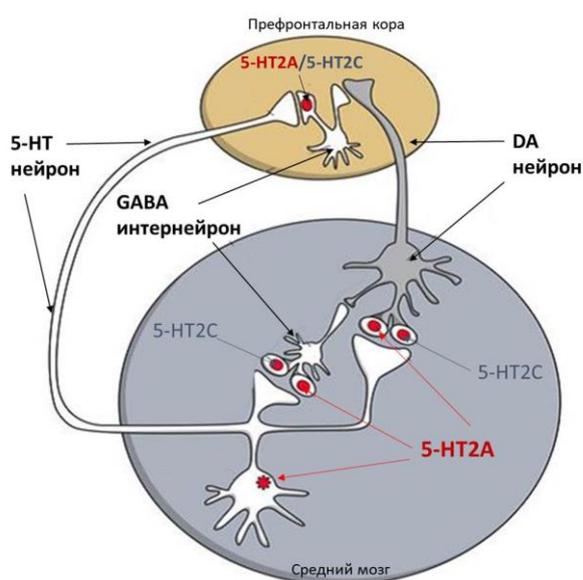


Рисунок 1.5 – Сеть взаимосвязанной иннервации серотонинергической и дофаминергической нейротрансмиссии по Loonen & Ivanova, 2016

Когнитивные дисфункции и негативные симптомы шизофрении ассоциированы с недостаточной функцией дофаминергической нейротрансмиссии мезокортикального пути. При антипсихотической терапии воздействие на 5-HT_{2A} приводит к стабилизации нейротрансмиссии дофаминергических нейронов в мезокортикальном и мезолимбическом путях (Hensler et al., 2013). Показана тесная взаимосвязь дофаминергической и серотонинергической иннервации. Стимуляция рецепторов 5-HT_{2A} в префронтальной коре усиливает активность дофаминергических нейронов вентральной области покрышки (VTA), увеличивая выделение дофамина в больших полушариях и среднем мозге. М-100907, селективный антагонист рецепторов 5-HT_{2A}, негативно влиял на активность не только серотонинергической, но и дофаминергической нейротрансмиссии. Таким образом, блокада рецепторов 5-HT_{2A} на пирамидальных нейронах префронтальной коры (PFC) уменьшает возбуждающее действие подкорковых регионов, потенциально вовлеченных в патогенез шизофрении, нормализуя функции восходящих моноаминергических путей (Hensler et al., 2013). Большинство атипичных антипсихотических препаратов являются антагонистами или частичными агонистами рецепторов 5-HT_{2A}, снижая базальный уровень активности рецептора (Дробижев, Овчинников, 2010).

1.5.2. Структура. Феномен «структурной гибкости» рецептора

Рецептор серотонина 2A (5-HT_{2A}) относится к родопсиноподобным мембранным белкам, имеет классическую структуру связанного с G-белками рецептора (GPCR): семь трансмембранных (ТМ) доменов и амфипатическую внутриклеточную петлю, рисунок 1.6А. Конститутивная форма белка состоит из 471 аминокислоты (NCBI Reference Sequence: NP_000612.1). Рецептор 5-HT_{2A} человека был клонирован в 1990 году и обладает наибольшей гомологией с рецепторами 5-HT_{2B} и 5-HT_{2C}: 41% и 46 %, соответственно (Branchek et al., 1990). В настоящее время активно изучают его кристаллическую структуру методом рентгеноструктурного анализа в комплексе с антипсихотическими

препаратами второго поколения с целью определения наиболее эффективного лиганда для связывания с рецептором, рисунок 1.6Б (Kimura et al., 2019).

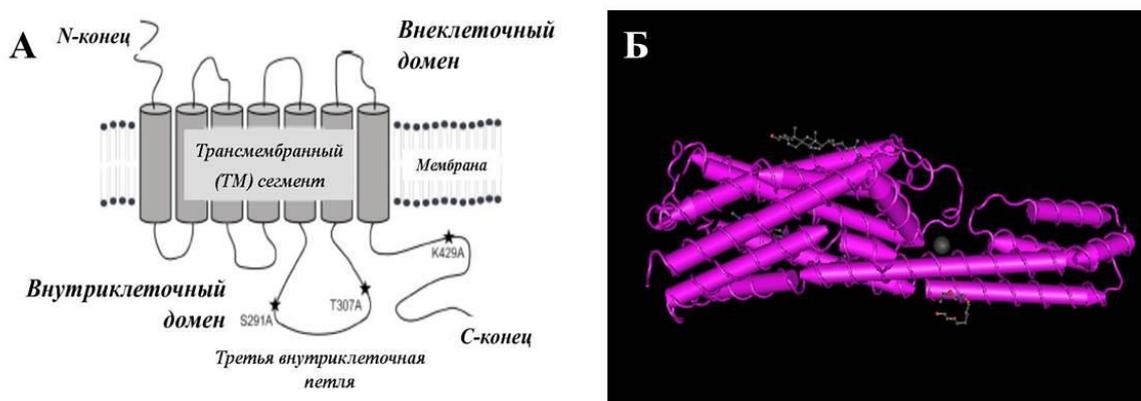


Рисунок 1.6 – Структура рецептора 5-НТ_{2А}. А – Схематическое представление строения рецептора 5-НТ_{2А} (модифицировано по Soman et al., 2020); Б – Кристаллическая структура 5-НТ_{2А} в комплексе с рисперидоном (заимствовано Kimura et al., 2019)

Канонический сигнальный путь 5-НТ_{2А} включает в себя активацию $G_{\alpha q/11}$ белков, передачу сигнала внутрь клетки, последующую активацию фосфолипазы С, которая инициирует накопление вторичных мессенджеров: инозитол 1,4,5-трифосфата и 1,2-диацилглицерина, высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных запасов и активацию протеинкиназы С.

Существует феномен передачи сигнала через рецепторы, связанные с G-белками, называемый «функциональная селективность» («агонист-направленная передача сигнала рецептора» или «предвзятый агонизм»): разные лиганды, аффинные к одному рецептору, могут дифференциально запускать различные сигнальные пути в результате плейотропии GPCR (структурной гибкости рецептора), приводящей к смещению стандартной конформации рецептора. Более того, один и тот же лиганд может активировать различные сигнальные пути, зачастую создавая проблему в однозначной классификации его как агониста или антагониста. Так, например, ЛСД является и агонистом рецептора 5-НТ_{2А}, активируя $G_{\alpha q/11}$, так и антагонистом, ингибируя $G_{\alpha i/0}$ белки (Garcia-Bea et al., 2019; Soman et al.,

2020). В настоящее время показано, что дифференциальная регуляция эндогенными лигандами, в том числе и фармакологическими препаратами, модулирует функциональную активность рецептора через эндоцитоз (деградацию белка) и эндосомальную сортировку (временную интернализацию с последующей рециркуляцией), значительно влияя на терапевтический эффект препарата (Raote et al., 2013).

1.6. Ген *HTR2A*

1.6.1. Структура. Локализация

Рецептор 5-HT_{2A} закодирован в гене *HTR2A*, расположенном на 13 хромосоме (13q14- q21). Впервые его структура, состоящая из трех экзонов общей протяженностью 20 кБ, была описана в 1992 году (Chen et al., 1992) с аннотированием оригинальной референсной последовательности (RefSeq) мРНК (NM_000621.1). Со времени первого аннотирования генетическая структура *HTR2A* подверглась трем пересмотрам: были удалены сайты клонирования и изменены аллели в полиморфных сайтах (NM_0006621.2), добавлен экзон 5`области (NM_0006621.3), удлинен 3` нетранслируемый регион (UTR), добавлена консенсусная последовательность сигнала полиаденилирования (NM_0006621.4). Согласно современным представлениям *HTR2A* состоит из четырех экзонов, разделенных тремя интронами, общей протяженностью более 65 кБ, и имеет альтернативные варианты сплайсинга транскриптов гена с участием II экзона (NM_001165947) (рисунок 1.7. (Ruble et al., 2016).



Рисунок 1.7 – Современная структурная организация *HTR2A*

1.7. Альтернативный сплайсинг

Разнообразие протеома эукариот определяется альтернативным сплайсингом, фундаментальным механизмом, направленным на повышение эффективности экспрессии генетической информации. Приблизительно 95% транскриптов мультиэкзонных генов подвергаются альтернативному сплайсингу, делая транскриптом человека намного сложнее, чем белок-кодирующий геном (Komor M. A. et al., 2017). В настоящее время в 33 версии (GRCh38.p13) консорциума Gencode (сведения на 16.01.2020) аннотировано 60662 генов и 227912 вариантов транскриптома человека (<https://www.gencodegenes.org>). В среднем, на один ген человека приходится 3,8 аннотированных транскриптов, а если рассматривать только белок-кодирующие гены, то отношение увеличивается до 4,2 к одному. Однако число аннотированных изоформ не полностью отражает сложность всех альтернативных событий сплайсинга в клетках. Развитие современных технологий изучения транскрипционного профиля тканей человека способствует пересмотру существующих данных о структуре различных генов и количестве их транскриптов (Ruble C.L. et al., 2016; Hu J. et al., 2017).

Показано, что доминирование основной формы транскрипта относительно других изоформ этого же гена, образуемых в ходе альтернативного сплайсинга, необходимо для поддержания нормальной клеточной физиологии. Однако основные принципы, которые определяют доминирование основной формы транскрипта, остаются неизвестными. В 2017 году были постулированы универсальные принципы частотного распределения изоформ транскрипта: (1) гены склонны экспрессировать все свои изоформы одновременно, но в разной степени; (2) основная и второстепенная доминантная изоформа гена составляет более 30% и 15 % от общей экспрессии транскрипта, соответственно (Hu et al., 2017). Однако механизмы, лежащие в основе этих фундаментальных наблюдений, остаются неясными, и данные факты были доказаны на генах, вовлеченных в онкогенез,

но распространяется ли это правило на другие гены, в настоящее время не известно.

Правильная экспрессия изоформ транскриптов, полученных в результате альтернативного сплайсинга одного гена, в настоящее время рассматривается как один из ключевых механизмов, обеспечивающих нормальную физиологию здоровых тканей. Аномально сплайсированная мРНК может приводить к функциональным изменениям белков, которые она кодирует, и как следствие, к развитию патологических процессов в клетках. В частности, абберантный сплайсинг ассоциирован с опухолевым процессом и метастазированием, вовлечен во множественные биологические процессы, связанные с онкотрансформацией. Например, использование альтернативного 5` сплайс-сайта *BCL2L1* приводит к «переключению» с проапоптотической на антиапоптотическую изоформу белка, способствуя уходу клеток от апоптоза, провоцируя онкогенез, альтернативное сплайсирование в 3` регионе *VEGFA* приводит к переходу от антиангиогенной к ангиогенной изоформе при раке и индуцирует ангиогенез (Komor et al., 2017; Climente-Gonzalez et al., 2017).

Изучению абберантного сплайсинга в патогенезе шизофрении в последнее время уделяется все больше внимания (Oldmeadow et al., 2014; Reble et al., 2017; Gandal et al., 2018; Latorre et al., 2019). Изначально работы были сосредоточены на аномальной регуляции глутаматергической нейротрансмиссии. Показано, что аномальная экспрессия семейства генов *CNIH* при шизофрении ассоциирована с корнихон-опосредованными аномалиями регуляции рецепторов глутамата, что предполагает новый механизм, способствующий патофизиологии заболевания (Drummond et al., 2012). Также было показано, что альтернативный сплайсинг *GADI*, гена фермента синтеза γ -аминомасляной кислоты, играет роль в профилировании экспрессии изоформ белка и может способствовать дисфункциям ГАМК-нейротрансмиссии в префронтальной коре и гиппокампе пациентов с шизофренией (Tao et al., 2017).

В одной из последних масштабных работ, опубликованных в *Nature*, проведено сравнение РНК сиквенса постмортальных образцов долсоратеральной префронтальной области 1695 пациентов с психическими заболеваниями (шизофрения, аутизм, биполярное расстройство) и 1000 лиц контрольной группы (без психических патологий) (Gandal et al., 2018). Оценивали такие показатели как вариативность мРНК сплайсинг-вариантов (по анализу стыков экзонов), уровень экспрессии определенных генов, вариативность изоформ транскриптов генов, ассоциированных с психическими заболеваниями по GWAS. Авторы сделали вывод, что при психических патологиях более 25% транскриптома различается в вариантах сплайсинга транскриптов мРНК, а также экспрессии генов, продукты которых вовлечены в нейронные, микроглиальные, астроцитарные взаимодействия, а также пути, вовлеченные в иммунный ответ (синтез интерферона). РНК-секвенирование показало повышение экспрессии 1709 генов, повышение количества изоформ 1254 генов, снижение экспрессии 1831 гена, и снижение количества изоформ 2274 генов, что свидетельствует о нарушении регуляции экспрессии большого количества генов при шизофрении. Анализ уровня экспрессии 944 участков некодирующей РНК выявил изменение уровня экспрессии 693 участков у пациентов с шизофренией (Gandal et al., 2018).

В настоящее время процесс альтернативного сплайсинга становится многообещающим объектом фармакотерапии (Lee, S.C., and Abdel-Wahab, O. 2016). Следует отметить, что большинство исследований в этой области сфокусированы на терапии онкопатологий. Например, опухоль легких, ассоциированная с доминированием протоонкогенной изоформы транскрипта *MET*, эффективно поддается фармакотерапии, мишенью которой служит *MET*. Также альтернативный сплайсинг участвует в механизмах лекарственной устойчивости: опухоли, не ответившие на терапию, нацеленную на *BRAF*, экспрессируют изоформы транскриптов *BRAF*, лишенные 4-8 экзонов. Аналогичным образом, при aberrантной активности сплайсинг-фактора

SRSF3 в клетках CD19 понижается эффективность иммунотерапии лейкемии (Climente-González H. et al., 2017). Таким образом, конкретные изменения в вариантах сплайсинга вызывают функциональные перестройки, которые обеспечивают избирательное преимущество опухолевым клеткам и могут представлять собой мишени терапии.

Исследования сплайсинг-вариантов генов при терапии психических патологий единичны. Показана дифференциальная регуляция транскрипции гена мозгового нейтрофического фактора (*BDNF*) после лечения антидепрессантами (Khundakar A.A., Zetterstrom T.S., 2006). В исследованиях на клеточных линиях и экспериментальных животных показано, что антипсихотические препараты обладают разным аффинитетом к изоформам белка рецептора дофамина D2: D2S и D2L, короткая D2S образуется в ходе альтернативного сплайсинга гена *DRD2*, «вырезанием» 6 экзона. Галоперидол, клозапин, сульпирид, хлорпромазин, антипсихотики как I, так и II поколения, обладают большим сродством к изоформе рецептора D2L, чем к укороченной форме (Xu et al., 2002). Изоформы белка D2S и D2L отличаются не только своими функциями, но и локализацией в клетке. D2S находятся на пресинаптических мембранах нейронов и регулируют высвобождение дофамина в синаптическую щель, D2L расположены на постсинаптических мембранах, участвуют в передаче сигнала (Barrie et al., 2012).

В регулировании серотонинергической нейротрансмиссии альтернативный сплайсинг играет существенную роль, усложняя функциональность системы за счет экспрессии тканеспецифичных изоформ транскриптов и разнообразия в уровнях фосфорилирования. Уровень серотонина контролируется активностью ферментов триптофангидроксилазой 2 (TPH2) и моноаминоксидазой (MAO-A) и работой серотонинового транспортера (SERT), каждый из перечисленных регуляторных элементов кодируется тремя возможными генами с семью различными вариантами сплайсинга для каждого. Комбинация этих изоформ транскриптов создает

многочисленные сценарии регулирования уровня серотонина в организме человека. Кроме того, альтернативные варианты сплайсинга значительно увеличивают разнообразие рецепторов 5-НТ (яркий пример - рецептор 5-НТ_{2C} обладает 33 белковыми изоформами, реализованными за счет альтернативного сплайсинга). Многочисленные изоформы рецепторов различаются по экспрессии, регуляции, структуре и чувствительности к лигандам (Latorre et al., 2019).

Согласно аннотированной последовательности мРНК в базе данных референсных последовательностей NCBI (NCBI Reference Sequence Database (RefSeq)) (NM_001165947) ген *HTR2A* подвержен альтернативному сплайсированию на участке между первым и третьим экзоном с образованием нескольких изоформ транскриптов: с усеченным вторым экзоном (2tr), с полностью отсутствующим вторым экзоном (2-) и конститутивная форма полной длины 2+, рисунок 1.8.

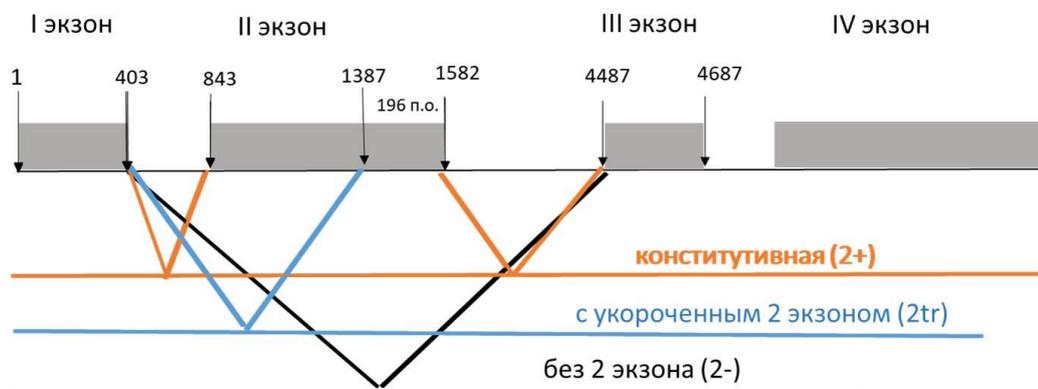


Рисунок 1.8 – Схематическое представление транскриптов при альтернативном сплайсинге региона int1/ex2/int2 гена *HTR2A*, согласно аннотации в базе данных RefSeq (NM_001165947)

Следует отметить, что количество изоформ транскриптов *HTR2A* постоянно пересматривается: в литературе описаны дополнительные варианты сплайсинга *HTR2A*, для которых еще не представлена аннотация в базе данных RefSeq. Например, изоформа, содержащая новый экзон длиной 118 п.о., расположенный в интроне 3 настоящей аннотации, и четыре

дополнительных изменения границ сплайсинга, приводящие к образованию новых вариантов сплайсинга. В результате последних исследований были обнаружены доказательства существования 12 различных экзонов, включая альтернативные, на смысловой нити *HTR2A* человека, Табл.1.2. (Ruble et al., 2016).

Таблица 1.2 – Перечень изоформ транскриптов *HTR2A* согласно современным представлениям

Изоформа транскрипта	Размер п.о.	Координаты по референтной последовательности hg 19/GRCh37	Источник
0	187	chr13: 47472087-47472273	Ruble CL et al., 2016
1ext	1465	chr13: 47470809-47472273	Smith et al, 2013
1int	2644	chr13: 47469630-47472273	Smith et al, 2013
1	403	chr13: 47470809-47471211	Аннотирован в RefSeq
2	740	chr13: 47469630-47469825	Аннотирован в RefSeq
2tr	196	chr13: 47469630-47470369	Аннотирован в RefSeq
2-	0	chr13: 47469630-47469630	Аннотирован в RefSeq
3	201	chr13: 47466525-47466725	Аннотирован в RefSeq
3a	118	chr13: 47458674-47458791	Guest et al, 2000
3b	1175	chr13: 47456022-47457197	Ruble CL et al., 2016
4	4098	chr13: 47405677-47409774	Аннотирован в RefSeq
4ext	9716	chr13: 47400058-47409774	Ruble CL et al., 2016, Smith et a., 2013

Известно, что изоформы белка 5-НТ_{2A} могут отличаться по функциональным свойствам и влиять как на степень аффинности рецептора к фармакологическому препарату, так и на эффективность работы рецептора (проведение сигнальной трансдукции), что, в свою очередь, может модулировать эффективность терапевтического воздействия.

1.8. Заключение

Серотонин является одним из важных элементов для поддержания гомеостаза организма и его нормального физиологического и психического статуса, стабилизируя нейротрансмиссию ЦНС и модулируя иммунный ответ. Как дисбаланс серотонинергической нейротрансмиссии, так и изменения уровня периферического моноамина ассоциированы с развитием патологических процессов, в том числе и психических патологий. Рецептор серотонина 2А (5-НТ_{2А}) широко представлен как в ЦНС, так и периферических тканях, отвечает за стабилизацию дофаминергической нейротрансмиссии в мезолимбических и мезокортикальных отделах головного мозга, является мишенью действия большинства антипсихотиков II поколения. Поскольку нейролептики обладают системным действием на организм, лимфоциты представляют собой адекватную модель изучения патогенеза расстройств шизофренического спектра и мониторинга антипсихотической терапии. Генетические варианты, уровень экспрессии, паттерн изоформ транскриптов гена *HTR2A* могут влиять на функциональные параметры рецептора 5-НТ_{2А}, тем самым участвуя в развитии патологических изменений и ответе организма на фармакологическую терапию. Следовательно, параметры рецептора 5-НТ_{2А} в лимфоцитах периферической крови могут вносить вклад в понимание патогенеза расстройств шизофренического спектра и служить биомаркером прогноза антипсихотической терапии.

Существует проблема прогнозирования эффективности и безопасности при назначении антипсихотиков, и поиск биомаркеров для определения риска развития шизофрении, а также исхода терапии, остается важной задачей.

Данное исследование сосредоточено на оценке характеристик рецептора серотонина 2 А в качестве возможных биомаркеров развития РШС и прогноза терапии нейролептиками, рассматривая лимфоциты периферической крови, с одной стороны, как часть нейро-иммуно-эндокринной системы, а с другой – как “упрощенную модель дофаминергического нейрона”, так как они

содержат рецепторы моноаминов на своей поверхности и подвергаются воздействию препаратов.

Таким образом, поскольку существует иммунный фенотип шизофрении, а рецептор серотонина 2А – основная мишень действия антипсихотических препаратов II поколения, изменения его характеристик на лимфоцитах могут быть потенциальными биомаркерами заболевания и прогноза терапии.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Характеристика обследуемых групп. Дизайн исследования

Работа выполнена в сочетанном дизайне проспективного лонгитудинального наблюдения психически больных с назначением антипсихотического лекарственного средства путем рандомизации и исследования по типу «случай-контроль» с привлечением лиц контрольной группы. В соответствии с правилами ICH GCP у пациентов и здоровых добровольцев после предоставления в доступной форме информации об исследовании было взято письменное согласие на участие в нем. Исследование проведено в соответствии с этическими положениями Хельсинкской декларации, а также Национальным стандартом Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005. Заключение этического комитета при Национальном медицинском исследовательском центре психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева № ЭК-И-70/14 от 18.09.2014.

В работу были включены пациенты мужского пола (первый психотический эпизод, актуальное психическое состояние) с установленным диагнозом «Расстройство шизофренического спектра» (F2 МКБ-10) одной из рубрик: «Шизофрения параноидная» F20.0 (41 человек), «Острое полиморфное психотическое расстройство с симптомами шизофрении» F23.1 (14 человек) и 5 человек с шизофреноподобными расстройствами другой нозологии (F.20.6, F.20.8, F.23.0 и F23.2) и 51 пациент с коморбидным течением «Параноидной шизофрении» и «Синдрома алкогольной зависимости» (F20.0 и F10.2). Пациенты в период обследования находились на стационарном лечении в отделении первого психотического эпизода СПб ГБУЗ «ПБ №1 им. П.П. Кащенко» с июня 2014 по апрель 2016 года.

Путем рандомизации пациенты, участвующие в исследовании, были отнесены к одной из двух групп терапии: галоперидол (типичный

антипсихотик) и оланзапин (препарат атипичного действия). Лечение проводилась в режиме монотерапии. Суточная доза препарата, клинические и антропометрические характеристики представлены в таблице 2.1. Статистически значимых различий в демографических параметрах и клинических данных между группами различными по фармакотерапии не обнаружено ($p = 0.166$, непарный Т-тест Стьюдента, с двумя степенями свободы).

Клинико-психопатологическая оценка состояния пациентов проводилась на основании диагностических критериев МКБ-10, психометрическая оценка - с использованием стандартизированных шкал: шкалы оценки позитивных и негативных синдромов - PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale), и ее подшкал, характеризующих позитивные нарушения, негативные нарушения, общепсихотические симптомы, симптомы подшкалы тревога/депрессия (Kay et al., 1987).

Безопасность антипсихотической терапии оценивалась по возникновению экстрапирамидных и метаболических побочных эффектов. Из всего спектра экстрапирамидных нарушений в данную работу вошла оценка ранних проявлений паркинсонизма и акатизии, как одних из наиболее распространенных негативных последствий терапии. Паркинсонизм оценивали при помощи шкалы Симпсона-Ангуса для оценки экстрапирамидных побочных эффектов (Simpson-Angus Scale for Extrapyramidal Symptoms, SAS). Развитие паркинсонизма диагностировалось при $SAS \geq 3$. Акатизию диагностировали с использованием шкалы акатизии Барнса (The Barnes Akathisia Rating Scale, BARS), при показателе: $BARS \geq 2$. Антипсихотик-индуцированный набор веса, являющийся одним из наиболее достоверных предикторов развития метаболического синдрома, детектировали на 28-й день терапии по изменению индекса массы тела (ИМТ) более чем на 7% от начального (Balt et al, 2011). ИМТ рассчитывали по формуле: $ИМТ = m/h^2$, где m – масса тела [кг], h – рост [м].

Таблица 2.1 – Антропометрические и клинические характеристики психически больных и лиц контрольной группы

Характеристики [†]	Расстройства шизофренического спектра		Коморбидное течение заболевания с синдромом алкогольной зависимости		Здоровые добровольцы (n=40)
	терапия галоперидолом (n = 30)	терапия оланзапином (n = 30)	терапия галоперидолом (n = 26)	терапия оланзапином (n = 25)	
Возраст (года) [ранг]	29.4 ± 8.07 [19 - 53]	26.6 ± 6.24 [18 - 43]	35.4 ± 9.62 [22 - 47]	35.2 ± 7.77 [22 - 50]	32.1 ± 11.55 [18 - 58]
Применяемая терапевтическая доза препарата (мг/день) [ранг]	20.0 ± 5.61 [5 - 30]	18.5 ± 3.88 [5 - 20]	18.1 ± 6.46 [4.50 - 33]	18.3 ± 5.42 [10 - 30]	Н/О
Семейный анамнез псих. заболеваний (да/нет)	5/25	5/25	2/24	3/22	0/40
Образование (неполное среднее/ среднее (в т.ч. специальное) / высшее/ незаконченное высшее)	3/16/8/3	5/10/8/7	5/11/5/5	3/9/7/6	0/0/36/4
Семейный статус (в браке/в разводе/одинок)	5/4/21	1/2/27	7/8/11	7/6/12	Н/О
Диагностируемый тип РШС (шизофрения параноидная / ОППР с симптомами шизофрении / другой тип РШС/ коморбидное течение с САЗ)	21/9/0/0	14/11/5/0	0/0/0/26	0/0/0/25	Н/О
ИМТ (kg/m²) [ранг]					
до терапии	23.4 ± 3.76 [17.0 - 31.7]	22.7 ± 4.08 [16.2 - 35.3]	21.0		25.2 ± 3.55 [16.4 - 32.9]
после терапии	23.1 ± 3.53 [17.4 - 31.1]	23.4 ± 3.91 [17.6 - 36.4]	22.7 ± 4.10 [17.2 - 32.7]	24.8 ± 2.95 [19.5 - 29.9]	Н/О
Вес (кг) [ранг]					
до терапии	74.33 ± 14.18 [47.10-101.30]	72.48 ± 12.83 [53.00-114.50]			80.47 ± 13.48 [55.00-110.00]
после терапии	76.15 ± 22.57	86.12 ± 34.83	70.51 ± 14.52	79.96 ± 13.53	Н/О

	[46.50-172.0]	[54.00-188.0]	[48.80-100.15]	[56.45-109.05]	
PANSS общий бал					
до терапии	91.4 ± 13.63	87.3 ± 18.62	90.7 ± 16.21	87.3 ± 11.67	H/O
после терапии	72.2 ± 17.51**	64.38 ± 18.75**	69.5 ± 18.15**	53.6 ± 13.73**	H/O
PANSS шкала P					
до терапии	23.7 ± 5.49	20.5 ± 4.54	22.8 ± 4.60	21.2 ± 5.19	H/O
после терапии	14.2 ± 3.44**	13.0 ± 3.97**	14.1 ± 5.77**	11.2 ± 3.62**	H/O
PANSS шкала H					
до терапии	25.0 ± 6.06	24.4 ± 7.54	24.8 ± 4.24	23.7 ± 5.00	H/O
после терапии	22.2 ± 7.14*	20.0 ± 6.49*	21.5 ± 5.46*	15.4 ± 5.52*	H/O
PANSS шкала O					
до терапии	43.0 ± 8.15	42.3 ± 10.95	43.1 ± 10.40	42.4 ± 6.70	H/O
после терапии	35.5 ± 9.21*	31.4 ± 10.35**	33.9 ± 8.72*	27.0 ± 6.26**	H/O
Шкала акатизии BARS (общий бал) [ранг]					
до терапии	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.04 ± 0.2 [0-1]	0.0 ± 0.0	H/O
после терапии	0.32 ± 0.69 [0-2]	0.32 ± 0.82 [0-4]	0.78 ± 1.22 [0-3]	0.38 ± 1.09 [0-4]	H/O
Шкала экстрапирамидных побочных эффектов SAS (общий бал) [ранг]					
до терапии	0.17 ± 0.54 [0-2]	0.07 ± 0.25 [0-1]	0.12 ± 0.60 [0-3]	0.19 ± 0.51 [0-2]	H/O
после терапии	6.44 ± 4.24 [0-14]	0.86 ± 1.46 [0-6]	5.47 ± 5.91 [0-23]	0.93 ± 2.02 [0-8]	H/O

ИМТ – индекс массы тела; ОППР – острое полиморфное психотическое расстройство; САЗ – синдром алкогольной зависимости; H/O – не определялось

† Все значения представлены как средние ± стандартное отклонение

*p=0.001

**p<0.001

Для изучения эффективности проводимой фармакотерапии (оценки клинического ответа), изучения динамики исследуемых параметров на фоне воздействия антипсихотиков, забор крови у пациентов и их психометрическое обследование проводилось в двух точках: до начала терапии и через четыре недели (28 ± 2 дня) от начала приема назначенного препарата. Дизайн исследования показан на рисунке 2.1.

Контрольная группа состояла из 144 здоровых мужчин, сопоставимых с группой больных по демографическим и антропометрическим характеристикам, не связанных между собой узлами родства, отрицающих прием антипсихотических препаратов и употребление психоактивных веществ, не состоящих на учете у психиатра.



Рисунок 2.1 – Дизайн исследования

2.2 Материал исследования

Материалом исследования служила периферическая венозная кровь, собранная в вакуумные пробирки с активатором свертывания для исследования сыворотки (концентрации цитокинов) и пробирки с 0.5 М ЭДТА (рН 8.0) в качестве антикоагулянта для молекулярно-генетической характеристики рецептора 5-HT_{2A}. Для получения чистой фракции сыворотки пробирку с активатором свертывания центрифугировали 10 минут с ускорением 1500 g (около 3000 об/мин).

2.3 Методы исследования

2.3.1 Выделение лимфоцитов из периферической крови

Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществлялось методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла. Венозную кровь разводили в пропорции 1:1 однократным раствором DPBS (Биолот, Россия) и наносили на слой фиколла (Ficoll-Paque PLUS (d=1,077), GE Healthcare Biosciences, США) в соотношении 1:2, затем центрифугировали при 300g в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо, содержащее мононуклеарные клетки, собирали пипеткой через верхний слой плазмы, дважды отмывали раствором DPBS (Биолот, Россия), каждый раз ресуспендируя и центрифугируя при 300g в течение 10 минут. Полученные клетки замораживали и хранили при температуре -80°C.

2.3.2 Выделение геномной ДНК из лимфоцитов периферической крови

Выделение геномной ДНК из ЛПК проводилось солевым методом (Маниатис и др., 1984). В пробирки с выделенными ЛПК, полученными

из 2.5 мл крови, добавляли 300 мкл буфера, содержащего: 0.01 М NaCl, 0.01 М Tris-HCl, 0.01 М ЭДТА (pH 8.0), 0.9% SDS, 100 мкг/мл протеиназы К, аккуратно ресуспендируя осадок. Образцы инкубировали при 37°C в течение 12 часов для проведения реакции протеолиза. К получившемуся гомогенному раствору добавляли 25 мкл раствора 6М NaCl, перемешивали и инкубировали при температуре +4°C 1 час. Далее к образцам добавляли по 300 мкл хлороформа, аккуратно перемешивали в течение 10 минут, после чего смесь центрифугировали 10 минут при 300 g, верхний слой смеси переносили в чистую пробирку и добавляли к нему 1 мл 96% этанола, охлажденного до +4°C. Аккуратно переворачивали закрытые пробирки до появления видимого преципитата, центрифугировали при температуре +4°C и 300g, супернатант удаляли. Дважды промывали осадок, добавляя по 1мл 70% этанола, охлажденного на -20°C и центрифугируя при 300g, с охлаждением до +4°C. Осадок высушивали при комнатной температуре в течение 24 часов, затем растворяли в 100 мкл стерильной воды. Полученные образцы ДНК хранили при +4°C. Выход ДНК составлял 40-50 мкг.

2.3.3 Выделение РНК. Реакция обратной транскрипции

Выделение тотальной РНК из ЛПК проводилось с использованием набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия), предназначенного для получения чистой фракции РНК из клеток и тканей, согласно инструкции производителя.

Перед началом работы с набором, необходимо было произвести следующие действия:

1. к каждому 1 мл RTL буфера добавить по 10 мкл β-меркаптоэтанола
2. к концентрату буфера RPE добавить 4 объема этанола 96-100% для получения рабочего раствора

К осадку из лимфоцитов добавляли 600 мкл буфера RTL, пипетируя осадок до полного его растворения. Затем к гомогенизированному лизату добавляли 600 мкл 70% этанола и также размешивали смесь пипетированием. Полученный образец, включая осадок, если он образовывался, переносили в колонку набора RNeasy mini kit, помещенную в 2,0 мл пробирку и центрифугировали 15 сек при 6700g, жидкость из нижней пробирки сливали, а колонку переносили обратно в пробирку. Далее добавляли 700 мкл буфера RW1 в каждый образец и центрифугировали закрытые пробирки 15 сек при 6700g, жидкость из нижней пробирки сливали. Затем к каждой колонке добавляли 500 мкл буфера RPE и центрифугировали при 6700g 2 минуты. Полученный осадок вместе с колонкой переносили в чистые пробирки 2,0 мл и для устранения остатков промывочного буфера и подсушивания мембраны, центрифугировали еще 1 мин при 6700g.

После этого необходимо было перенести колонки в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку с крышкой и на каждую мембрану колонки нанести по 50 мкл воды, свободной от нуклеаз и центрифугировать минуту при 11000g. Полученные образцы хранили при -20°C .

Чистоту выделенных РНК-образцов проверяли спектрофотометрически: при отношении их оптических плотностей при длинах волн 260 нм и 280 нм ≥ 2.0 , а при 260 нм и 230 нм ≥ 1.7 , образцы РНК считались достаточно очищенными от примесей. Полученные образцы хранили при -80°C .

Для получения комплементарной ДНК проводили реакцию обратной транскрипции мРНК при помощи набора Revert Aid First Strand cDNA (Thermo Scientific, USA) согласно инструкции производителя.

В пробирки добавляли по 6 мкл H₂O свободной от нуклеаз RNase-free H₂O и по 1 мкл олигонуклеотидов Oligo(DT), предварительно размешав их на вортексе, и ставили пробирки на лед. После этого, в пробирки к полученной смеси добавляли по 5мкл мРНК и инкубировали при температуре 37°C в течение 5 минут. Далее помещали пробирки обратно на лед и вносили следующие компоненты по порядку:

1. 4 мкл Buffer
2. 1мкл Riboblock для ингибирования рибонуклеаз
3. 2 мкл dNTP

Инкубировали смесь при температуре 60°C в течение 5 минут, после чего добавляли к смеси 2мкл ревертазы, с последующей инкубацией при температуре 42°C в течение 1 часа.

Все манипуляции с мРНК и реагентами для реакции обратной транскрипции проводились на льду. Образцы кДНК хранились при +4°C.

2.3.4 Количественное определение экспрессии гена *HTR2A*

Определение относительного уровня мРНК гена *HTR2A* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени (РВ) с использованием флюорогенного зонда TaqMan на приборе CFX96 Touch (BioRad, США). В качестве эндогенного контроля (стандартизации количества образца кДНК, взятого в реакцию) были взяты конститутивно экспрессирующиеся в клетках гены «домашнего хозяйства» *GNB2L1* (guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like), *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) и *ACTB* (β -actin). Дизайн праймеров и проб референсных генов частично разработан самостоятельно с помощью программы Primer Express™ (Applied Biosystems), частично заимствован из литературных источников, представлен в таблице 2.2. Взятые в работу олигонуклеотидные последовательности, в качестве праймеров, были комплементарны к

местам экзон-экзонных стыков, что обеспечивало избирательную амплификацию кДНК, исключая геномную. Для оценки количественного определения экспрессии гена *HTR2A* в целом, был выбран наиболее транскрипционно консервативный участок 4 экзона (наименее подверженный альтернативному сплайсингу). Структура праймеров и зонда гена *HTR2A* заимствована из литературного источника (Smith R.M. et al., 2013). Для минимизации вариаций результатов разных постановок (inter assay variation) использовали экзогенный контроль (смесь образцов кДНК, полученную от нескольких доноров), который проставляли при каждом эксперименте (в каждой анализируемой плашке).

Таблица 2.2 – Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

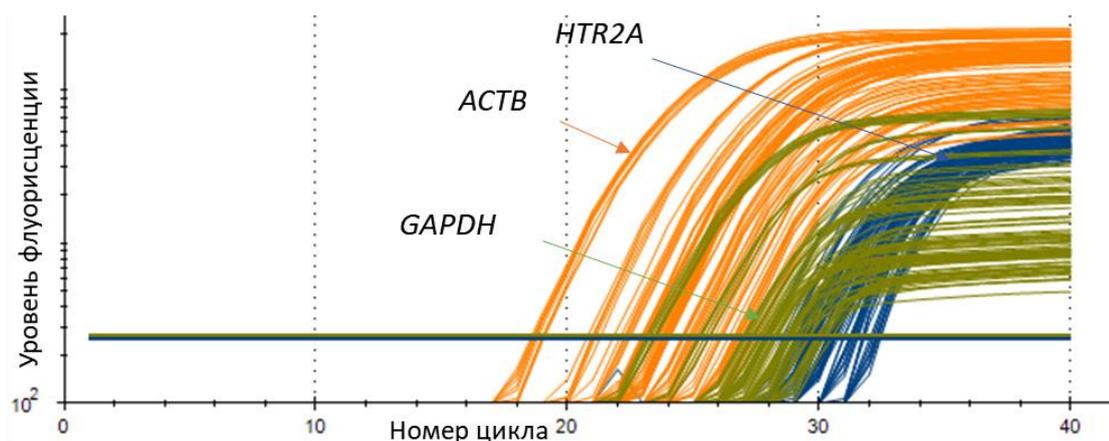
ген	конструкция	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
HTR2A	праймеры	прямой: GCA AGATGCCAAGACAACAGATAA обратный: TCACACACAGCTCACSTTTTCAT
	зонд	FAM-TGGTTGCTCTAGGAAAGCAG-RTQ1
GNB2L1	праймеры	прямой: GAATACCCTGGGTGTGTGCAA обратный: GGACAGAAGACACCCACTTCG
	зонд	HEX-TACACTGTCCAG GATGAGA-BHQ2
GAPDH	праймеры	прямой: GGAAGCTCACTGGCATGGC обратный: TAGACGGCAGGTCAGGTCCA-3'
	зонд	R6G-CCCCACTGCCAACGTGTCAGTG- BHQ1
ACTB	праймеры	прямой: TCACCGAGCGCGGCT обратный: TAATGTCACGCACGATTTCCC
	зонд	ROX-CAGCTTCACCACCACGGCCGA-RTQ2

Реакцию амплификации для каждого образца проводили в трех повторях в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 2.0 мМ MgCl₂ (Thermo Scientific, США), 2.5 мМ каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 15 пМ каждого праймера и 25 пМ флуорогенного зонда, 5 ед акт термостабильной Taq ДНК полимеразы (Биосан, Россия) и 1 мкг кДНК, в 96-луночных планшетах по схеме: 94°C в течение 15 секунд и 60°C – 60 секунд, 45 циклов. Реакцию проводили в одной лунке для трех генов (*HTR2A*, *GNB2L1*, *GAPDH*) или (*HTR2A*, *GAPDH*, *ACTB*), с использованием флуорогенных меток FAM и HEX, ROX и R6G (Синтол,

Россия). В результате проведения ПЦР были получены кинетические кривые, которые отображали накопление продуктов ПЦР (Рисунок 2.2).

Рисунок 2.2 – Кинетические кривые, полученные в ходе ПЦР-РВ для генов *HTR2A*, *GAPDH*, *ACTB*

Расчет относительного уровня мРНК гена *HTR2A* проводился методом относительных измерений $2^{-\Delta\Delta Ct}$, при помощи программного обеспечения Bio Rad CFX96 по формуле, вычисляющей нормализованную экспрессию на основании рассчитанного относительного количества (RQ) при



принятой эффективности 2 (руководство по эксплуатации CFX96, 2013):

$\Delta\Delta Ct$ образца (*HTR2A*)

$$= \frac{RQ \text{ образца } (HTR2A)}{(RQ \text{ образца (реф. 1)} \times RQ \text{ образца (реф. 2)} \times \dots \times RQ \text{ образца (реф. } n))^{1/n}}$$

где:

RQ – относительное количество образца,

Реф. = референс-мишень в эксперименте, включающем одну или несколько референс-мишеней в каждом образце,

HTR2A = целевой ген (одна мишень).

Средний показатель относительного количества экспрессии гена *HTR2A* представлен в работе в виде: медиана, нижний и верхний квартили (Lq÷Hq).

2.3.5 Определение относительного уровня мРНК изоформ транскриптов II экзона гена *HTR2A*

Относительный уровень экспрессии изоформ транскриптов II экзона гена *HTR2A* проводился ПЦР-РВ в системе CFX96 Touch (Bio Rad, США) с использованием красителя EVA Green. Реакция амплификации проводилась в реакционной смеси (V=20 мкл), содержащей 5 нг кДНК в качестве матрицы, 25 mM MgCl₂ (Thermo Scientific, США), 2.5 mM каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 25 пМ прямого (For) и обратного (Rev) праймеров (Синтол, Россия), 1 ед акт Taq ДНК полимеразы (Биосан, Россия) и ПЦР-буфера с красителем EVA Green (Синтол). Условия амплификации - начальная денатурация: 3 мин при 95⁰С, далее 36 циклов: плавление при 95⁰С – 30 с, отжиг при 60⁰С – 30 с, синтез – 72⁰С (30 с). Уровень мРНК каждого из сплайсинг вариантов II экзона *HTR2A* (E2+, E2-, E2tr) был нормализован относительно уровней экспрессии генов *GNB2L1* и *GAPDH*, взятых в качестве эндогенных контролей. Структура праймеров представлена в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Структура праймеров для изучаемых изоформ *HTR2A* и гена домашнего хозяйства *GAPDH* для проведения ПЦР-РВ.

Название праймера	Расположение	Последовательность (5' - 3')
E1 FOR	Exon 1	CTGTGAGAGATGCAGCGAGTC
E3 REV	Exon3	CCAGACTGCACAAAGCTTGC
E2+Rev	Exon 2- Exon 1	TCGGGAAGATAAATGTCATTTGTC
E2-Rev	Exon 3- Exon 1	GCCACCGGTACCATTTGTC
E2trRev	Exon2tr – Exon 1	CAGACCAGTTTTTTTCATTTGTCTTC
<i>GAPDH</i> For	Exon 1	GAAATCCCATGTCTTCCAGG
<i>GAPDH</i> Rev	Exon 10	GAGCCCCAGCCTCCATG

Праймеры для *GNB2L1* представлены в Таблице 2.2. Последовательности олигонуклеотидов, используемых в качестве праймеров, для анализа изоформ транскриптов взяты из литературного источника (Ruble et al., 2016); - для амплификации генов-референсов была разработана при помощи программы Primer Express™ (Applied Biosystems). Реакции амплификации каждой изоформы и генов-референсов *GAPDH*, *GNB2L1* проводились в отдельных лунках. Кинетические кривые накопления ПЦР-продуктов представлены на рис. 2.3.

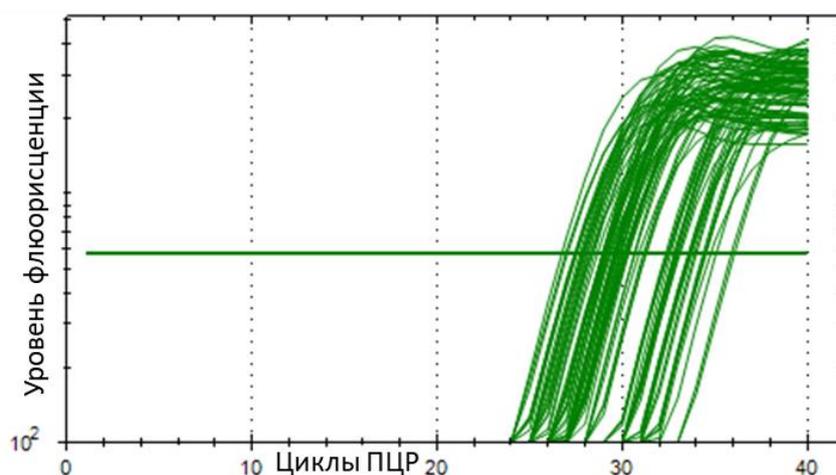


Рисунок 2.3 – Кинетические кривые, полученные в ходе ПЦР-РВ для изоформ транскриптов E2+, E2-, E2tr гена *HTR2A* и генов *GAPDH*, *ACTB*

2.3.6. Идентификация генетических вариантов rs6311 и rs6313 гена *HTR2A*

Определение однонуклеотидных полиморфных вариантов (ОПВ) - 1438 A/G (rs6311) и 102 T/C (rs6313) гена *HTR2A* проводилось методом анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) с последующей визуализацией в полиакриламидном геле (Маниатис и др., 1984), детализация методики представлена в табл. 2.4. В качестве матрицы реакции использовали 25 нг геномной ДНК, выделенной из

лейкоцитов периферической крови солевым методом (Маниатис и др., 1984). Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ сульфата аммония, 0.1% Triton X-100, соответствующую концентрацию MgCl₂ (Thermo Scientific, США), 2.5 мМ каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 25 пМ прямого (For) и обратного (Rev) праймера (Синтол, Россия), 1 ед акт Taq ДНК полимеразы (Биосан, Россия).

Таблица 2.4 – Детализация методики анализа ОПВ rs6311, rs6313 *HTR2A*

ОПВ	Последовательность праймеров (5'-3')	Литературный источник	Температура С°	MgCl ₂ (mM)	Эндонуклеаза	Размер продукта реакции (п.о.)
rs6311-1438 A>G	For: AGCTGCAAGG TAGCAACAGC Rev: AACCAACTTA TTTCCTACCAC	Nomura M. et al., 2006	58	1.5	MspI	A=468 G=244+224
rs6313 102 T>C	For: AACTACGAAC TCCCTAA Rev: GTATGTTTCCA GCAAT	Gong P. et al., 2015	56	2.5	MspI	T=242 C=63+179

Для амплификации фрагмента с rs6311, в реакционную смесь добавляли 0.5 мкл 100% диметилсульфоксида (DMSO) (Amresco, США). Условия амплификации: начальная денатурация 3 мин при 95° С; 36 циклов по 30 сек при 95° С, соответствующей температуре отжига и 72°С; и заключительный синтез при 72°С в течение 5 мин.

Эндонуклеазное расщепление 5 мкл ПЦР продукта проводили с использованием 5 ед акт фермента рестрикции Msp I (Thermo Scientific, США) при 37°С в течение 3 часов в однократном буфере Tango (Thermo Scientific, США). Анализ ПДРФ проводили путем электрофоретического разделения в 6% полиакриламидном геле в присутствии маркера

молекулярной массы (Thermo Scientific, США) с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете, рисунок 2.4.

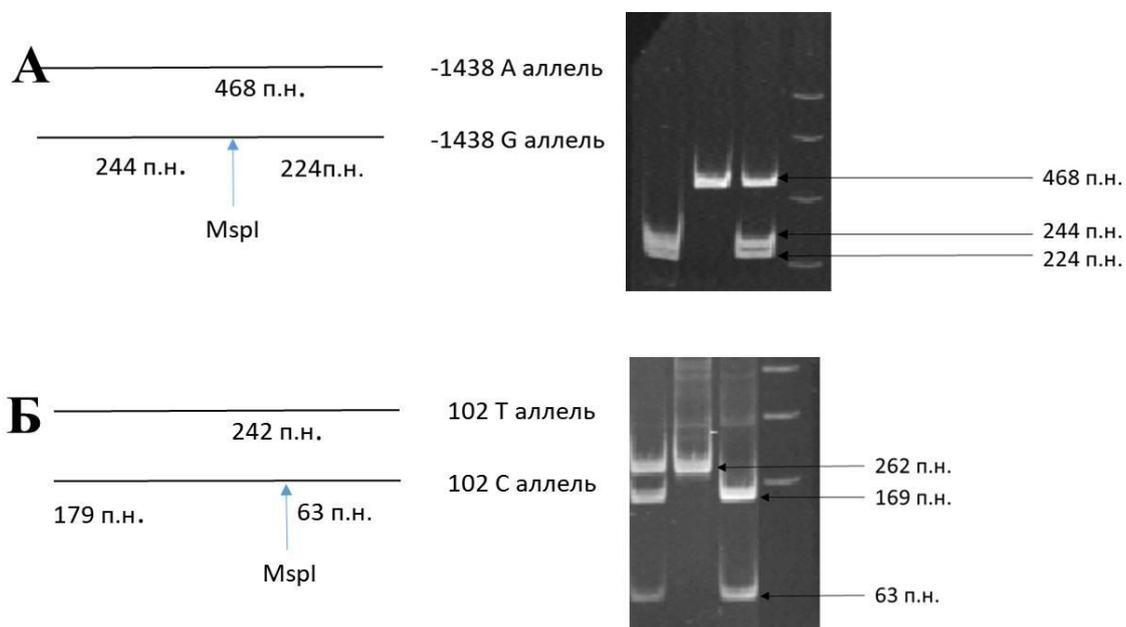


Рисунок 2.4 – Схема и электрофореграмма разделения продуктов рестриционного анализа. Идентификация вариантов (А) -1438 А/Г (rs6311) и (Б) 102 Т/С (rs6313) гена *HTR2A*.

2.3.7 Определение количества белка рецептора 5-НТ_{2А}

Определение количества белка рецептора 5-НТ_{2А} в ЛПК проводили в три этапа:

- Лизис лимфоцитов периферической крови
- Количественный анализ общего белка ЛПК
- Количественный анализ белка 5-НТ_{2А}

Для лизиса лимфоцитарных клеток к осадку, полученному в пункте 2.3.1, добавляли, предварительно встряхнув его, буфер, содержащий 1% Triton X-100, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% SDS, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris (pH 8.0) и 1% смесь ингибиторов протеаз Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, Germany).

Пробирки со смесью лимфоцитов и буфера держали на льду 30 минут, периодически разбивая осадок на вортексе, до полного растворения осадка, далее центрифугировали с охлаждением до +4 °С в течение 20 мин при 300 g. Супернатант переносили в чистые пробирки. Хранили образцы при температуре -80 °С.

Количественный анализ суммарного белка ЛПК проводили с помощью набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA) согласно инструкции производителя.

Полученные ранее фракции мононуклеарных клеток предварительно разводили в 10 раз буфером для разведения белка, в состав которого входили: 1M Tris, 5M NaCl.

В плашку на 96 лунок наносили сначала стандарты, предварительно встряхнув на вортексе, затем, пипетируя разведенные фракции мононуклеарных клеток в двух повторах по 25 мкл в каждую лунку.

Рабочий раствор BCA (Bicinchoninic acid) разводили в пропорции 50:1 Реагента А и Реагента В, входящих в набор, раскапывали в плашку по 200мкл и затем инкубировали при температуре 37°С в течение 30 минут.

Стандартную кривую строили с использованием разведения белка бычьего сывороточного альбумина (BSA), известной концентрации: 2000 мкг/мл, 1500 мкг/мл, 1000 мкг/мл, 750 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 125 мкг/мл, 25 мкг/мл, входящего в используемый набор. Для подготовки альбуминового стандарта (BSA) проводили разведения в пробирках 1,5мл согласно схеме производителя.

Определение концентрации общего белка каждого образца проводили в двух повторах на спектрофотометре xMark (Bio-Rad, USA) при длине волны 562 нм. Концентрацию изучаемых образцов рассчитывали путем построения калибровочного графика зависимости

оптического поглощения (562 нм) от концентрации белка (мкг/мл) (рис. 2.5) и вычисления по уравнению: $y = ((A-D)/(1+(conc/C)^B))+D$, согласно программному обеспечению прибора.

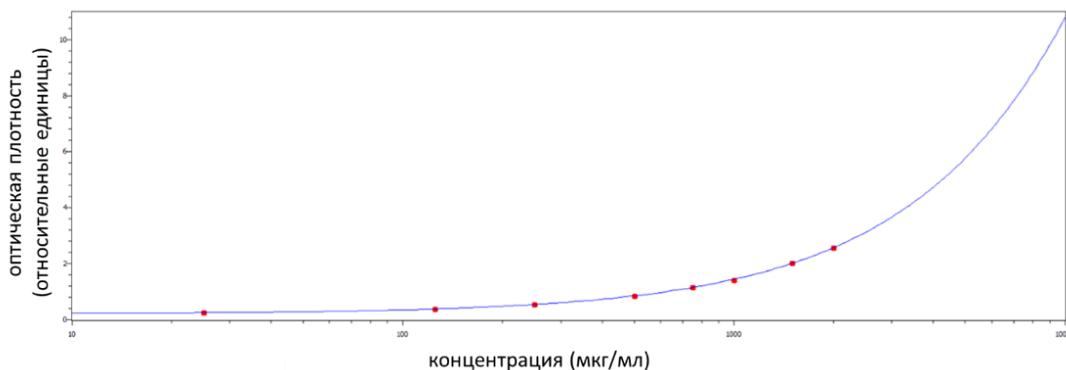


Рисунок 2.5 – Калибровочный график для определения концентрации общего белка лимфоцитов периферической крови

Количество белка 5-НТ_{2A} в ЛПК определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием набора ELISA kit for 5-Hydroxytryptamine Receptor 2A (HTR2A) (Cloud-Clone Corp, США) согласно инструкции производителя. Перед работой все реагенты набора были доведены до комнатной температуры.

Стандарт, входящий в состав набора, разводили разбавителем до концентрации 10 нг/мл. Далее в семи пронумерованных 1,5 мл пробирках проводили серию разбавлений стандарта до получения концентраций 10 нг/мл, 5 нг/мл, 2,5 нг/мл, 1,25 нг/мл, 0,625 нг/мл, 0,312 нг/мл, 0,156 нг/мл, согласно схеме производителя. Восьмая пробирка содержала только разбавитель, концентрация стандарта в ней была 0 нг/мл.

В каждую лунку плашки с антителами к рецептору 5-НТ_{2A}, входящую в состав набора, добавляли по 100 мкл разведенных стандартов и ЛПК и инкубировали при температуре 37°C в течение 60 минут. После чего удаляли жидкость из плашки, добавляли раствор А по 100 мкл и также инкубировали в течение часа при 37°C. Далее к подсушенной плашке добавляли по 100 мкл раствора В, инкубировали при 37 °C в

течение 30 мин и промывали буфером. По окончании промывки в каждую лунку добавляли 90 мкл красящего раствора.

Измерение концентрации анализируемого белка осуществляли на спектрофотометре xMark (Bio-Rad, USA). Расчет концентрации проводили путем построения калибровочного графика зависимости оптического поглощения при длине волны 450 нм и концентрации белка (нг/мл) (рис. 2.6).

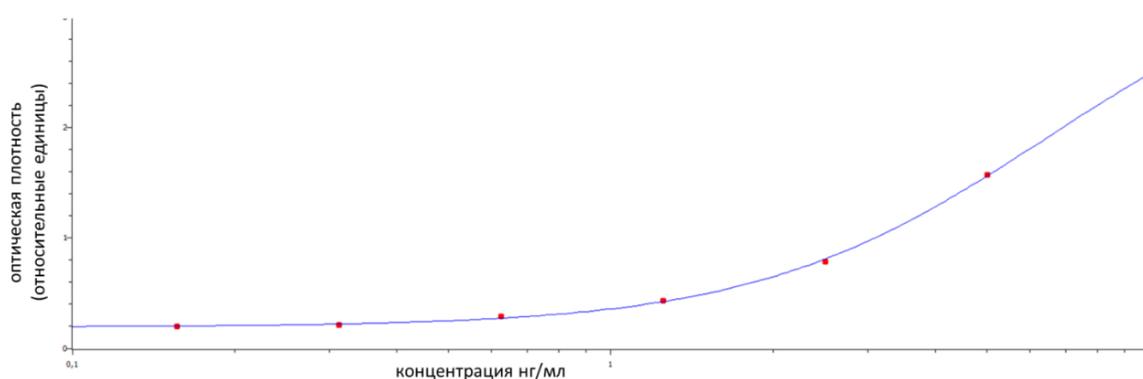


Рисунок 2.6 – Калибровочный график для определения концентрации белка 5-НТ_{2А} (нг/мл) в ЛПК

Концентрацию белка 5-НТ_{2А} в каждом образце нормировали на количество общего белка и представляли в нг на 1 мг белка клеточного лизата (нг/мг).

2.3.8 Иммуноферментный анализ концентрации цитокинов ИЛ-6, ИЛ-1 β и TGF-1 β в сыворотке крови

Оценку цитокинового профиля проводили с помощью метода иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов ELISA kit (Cloud-Clone Corp, USA) согласно инструкции производителя. Концентрация исследуемых цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-1 β и TGF-1 β) определялась в 100 мкл сыворотки и выражалась в пг/мл. Оптическую плотность оценивали на спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Определение концентрации IL-6 в сыворотке крови

Перед началом работы все реагенты приводили к комнатной температуре.

Стандарты, входящие в состав набора, разводили разбавителем до концентрации 500 пг/мл. Далее в семи пронумерованных 1,5мл пробирках проводили серию разбавлений стандарта до получения концентраций 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62.5 пг/мл, 31.2 пг/мл, 15.6 пг/мл, 7.8 пг/мл, согласно схеме производителя. Восьмая пробирка содержала только разбавитель, и концентрация стандарта в ней была 0 нг/мл.

1. В каждую лунку добавили по 100 мкл стандарта или образца, инкубировали 1 час при 37°C.
2. Перемешивали, а затем добавили по 100 мкл приготовленного реагента детекции А. Инкубировали 1 час при 37°C.
3. Перемешивали, а затем промывали лунки 3 раза промывочным буфером.
4. Добавили по 100 мкл подготовленного реагента для детекции В, инкубировали 30 минут при 37°C.
5. Перемешивали и промывали лунки промывочным буфером 5 раз.
6. Добавляли по 90 мкл раствора субстрата. Инкубировали 10-20 минут при 37°C, защищая от света.
7. Добавляли по 50 мкл стоп-раствора, затем немедленно производили считывание на спектрофотометре при 450 нм. Расчет концентрации проводили путем построения калибровочного графика зависимости оптического поглощения при длине волны 450 нм и концентрации белка (нг/мл) (рис. 2.7). Вычисления

проводили по уравнению: $y = ((A-D)/1 + (conc/C)B) + D$, используя программное обеспечение прибора.

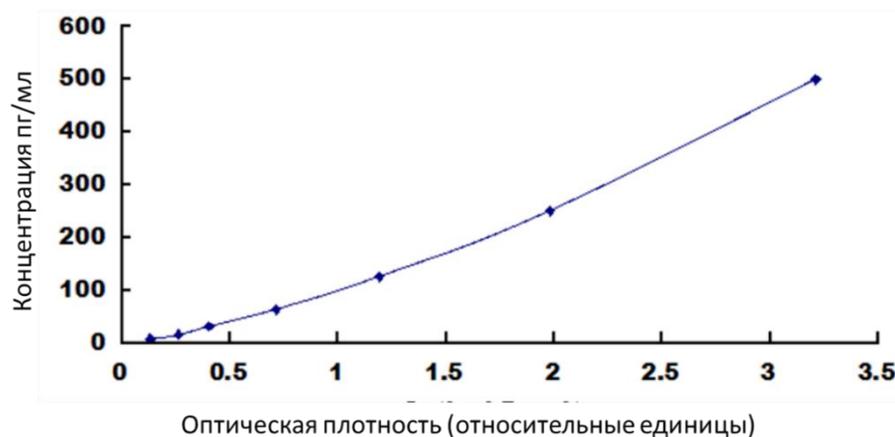


Рисунок 2.7 – Калибровочный график для определения концентрации белка IL-6 в сыворотке крови.

Определение концентрации IL-1 β в сыворотке крови

До начала работы все реагенты держали 10-20 минут при комнатной температуре.

Стандарты, входящие в состав набора, разводили разбавителем до концентрации 1000 пг/мл. Далее проводили серию разбавлений стандарта до получения концентраций: 1000 пг/мл, 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62.5 пг/мл, 31.2 пг/мл, 15.6 пг/мл. Концентрация стандарта в восьмой пробирке была 0 нг/мл.

1. В каждую лунку добавили по 100 мкл стандарта или образца, инкубировали 1 час при 37°C.
2. Перемешивали, а затем добавили по 100 мкл приготовленного реагента детекции А. Инкубировали 1 час при 37°C.
3. Перемешивали, а затем промывали лунки 3 раза промывочным буфером.
4. Добавили по 100 мкл подготовленного реагента для детекции В, инкубировали 30 минут при 37°C.

5. Перемешивали и промывали лунки промывочным буфером 5 раз.
6. Добавляли по 90 мкл раствора субстрата. Инкубировали 10-20 минут при 37°C, защищая от света.
7. Добавляли по 50 мкл стоп-раствора, и немедленно проводили считывание на спектрофотометре при 450 нм. Расчет концентрации проводился при помощи калибровочного графика зависимости оптического поглощения при длине волны 450 нм и концентрации белка (нг/мл) (рис. 2.8) и вычисления по уравнению: $y = ((A-D)/1+(conp/C)B)+D$, используя программное обеспечение прибора.

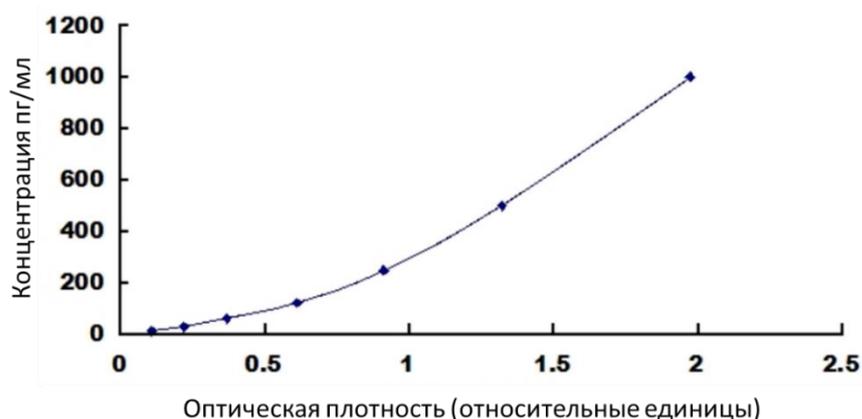


Рисунок 2.8 – Калибровочный график для определения концентрации белка IL-1 в сыворотке крови.

Определение концентрации TGF-1 β в сыворотке крови

До начала работы все реагенты находились 10-20 минут при комнатной температуре.

Активация латентного TGF-1 β в иммуноактивную форму осуществлялась 1М HCl, с последующей нейтрализацией 1.2 М NaOH / 0.5 М HEPES.

К 50 мкл сыворотки добавляли 10 мкл 1 М HCl. Хорошо перемешивали образцы. Далее инкубировали 10 минут при комнатной

температуре. Затем нейтрализовали подкисленный образец, добавив 10 мкл 1,2 М NaOH/0,5 М HEPES, тщательно перемешивали. Далее добавляли в каждую лунку по 80 мкл стандартного разбавителя, перемешивали и проводили анализ немедленно. Концентрацию, полученную по стандартной кривой, умножали на соответствующий коэффициент разведения, равный 3.

1. Стандарты, входящие в состав набора, разводили разбавителем до концентрации 1000 пг/мл. Далее проводили серию разбавлений стандарта до получения концентраций 1000 пг/мл, 500 пг/мл, 250 пг/мл, 125 пг/мл, 62.5 пг/мл, 31.2 пг/мл, 15.6 пг/мл. Восьмая пробирка содержала только разбавитель. В каждую лунку добавили по 100 мкл стандарта или образца, инкубировали 1 час при 37°C;
2. Перемешивали, а затем добавили по 100 мкл приготовленного реагента детекции А. Инкубировали 1 час при 37°C.
3. Перемешивали, а затем промывали лунки 3 раза промывочным буфером.
4. Добавили по 100 мкл подготовленного реагента для детекции В, инкубировали 30 минут при 37°C.
5. Перемешивали и промывали лунки промывочным буфером 5 раз.
6. Добавляли по 90 мкл раствора субстрата. Инкубировали 10-20 минут при 37°C, защищая от света.
7. Добавляли по 50 мкл стоп-раствора, и незамедлительно проводили считывание на спектрофотометре при 450 нм. Расчет концентрации проводился при помощи калибровочного графика зависимости оптического поглощения при длине волны 450 нм и концентрации белка (нг/мл) (рисунок 2.9) и вычисления по уравнению: $y = ((A - D) / (1 + (conc/C)^B)) + D$, при помощи программного обеспечения прибора.

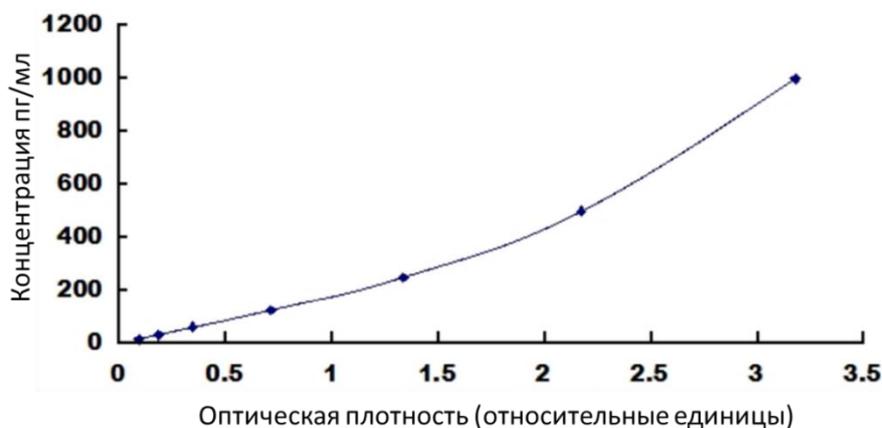


Рисунок 2.9 – Калибровочный график для определения концентрации TGF-1 β в сыворотке крови.

2.3.9. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программы SPSS версия 22.0 (IBM, USA). Для проверки статистических гипотез о виде распределения данных использовали W-тест Шапиро-Уилка. Так как изучаемые переменные (количество мРНК и белка) имели существенное отклонение от нормального распределения, сравнение показателей проводили при помощи непараметрических критериев: между группами, различающимися по фармакотерапии, генотипу, динамике по шкале PANSS, - критерия Манна-Уитни, между визитами внутри исследуемой группы – критерия Фридмана для связанных выборок; корреляционные зависимости – критерия корреляции Спирмена. Уровень значимости для всех использованных критериев – $p < 0.05$. Данные представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей ($Lq \div Hq$).

Соответствие распределения частот генетических вариантов rs6311, rs6313 *HTR2A* равновесию Харди-Вайнберга в изучаемых группах проводили с помощью точного теста Фишера: $(p^2 + 2pq + q^2 = 1)$.

Сравнение распределения генотипов между группами выполняли с использованием критерия χ^2 . Оценку неравновесия по сцеплению ОПВ rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* (коэффициент сцепления D' , коэффициент корреляции r^2) проводили с использованием программного обеспечения Haploview (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Характеристики рецептора серотонина 2A (5-НТ_{2A}) лимфоцитов периферической крови в норме и при психических патологиях

3.1.1. Относительное количество мРНК гена *HTR2A* и концентрация белка рецептора 5-НТ_{2A} у пациентов с психическими расстройствами и лиц контрольной группы

В ходе исследования были измерены биохимические характеристики рецептора *HTR2A* (относительное количество мРНК и концентрация белка *HTR2A*) в лимфоцитах периферической крови пациентов с РШС и контрольной группе. Проверка статистических гипотез о виде распределения данных (уровень мРНК *HTR2A*, уровень мРНК изоформ II экзона *HTR2A*, концентрация белка 5-НТ_{2A}) с использованием *W*-теста Шапиро-Уилка и критерия Колмогорова-Смирнова показала отклонение от нормального распределения данных во всех анализируемых группах. Преобразование значений путем логарифмирования не позволило получить нормальное распределение. Таким образом, обработка результатов проводилась с использованием непараметрических критериев, а показатели средних представлены в виде медианы, первого и третьего квартилей ($Lq \div Hq$). частотных распределений параметров от нормального распределения в изучаемых группах.

В качестве фактора риска развития психических патологий был определен относительный уровень мРНК гена *HTR2A* и количество белка рецептора 5-НТ_{2A} в ЛПК у пациентов с РШС, коморбидным течением РШС с САЗ в актуальном психическом состоянии (до терапии) и лиц контрольной группы.

Относительный уровень мРНК гена *HTR2A* составил 0.75 (0.37÷1.53), 0.65 (0.22÷1.22) и 0.30 (0.04÷0.79) единиц для лиц

контрольной группы, группы пациентов с РШС и выборки пациентов с коморбидным течением РШС с САЗ, соответственно. Количество белка рецептора составило 7.87 (5.52÷11.42), 7.99 (3.53÷10.79) и 4.72 (3.41÷6.53) нг/мг для лиц контрольной группы, группы пациентов с РШС и выборки пациентов с коморбидным течением РШС с САЗ, соответственно. Выборка пациентов с расстройствами шизофренического спектра осложненными САЗ, характеризовалась низким уровнем экспрессии *HTR2A*, а также количеством белка рецептора 5-НТ_{2A} ($p=0.001$), тогда как между лицами контрольной группы и пациентами с неотягощенным течением РШС статистически достоверных отличий в показателях изучаемых характеристик выявлено не было ($p=0.399$ и $p=0.412$) (Рисунок 3.1 и 3.2).

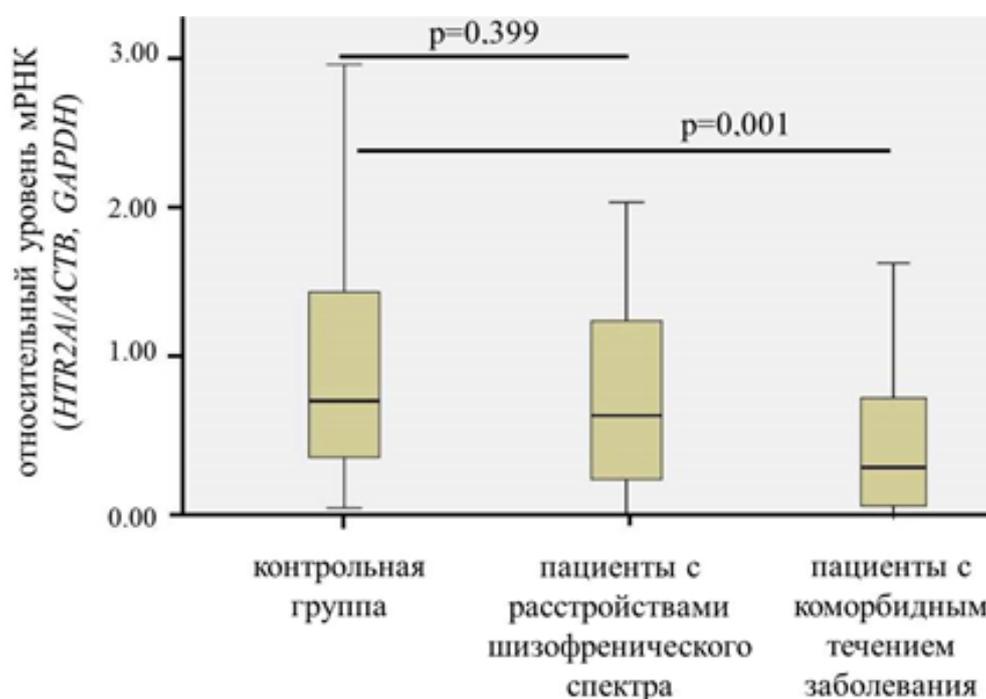


Рисунок 3.1 – Относительный уровень мРНК гена *HTR2A* в ЛПК у пациентов с психическими патологиями до лечения и лиц контрольной группы

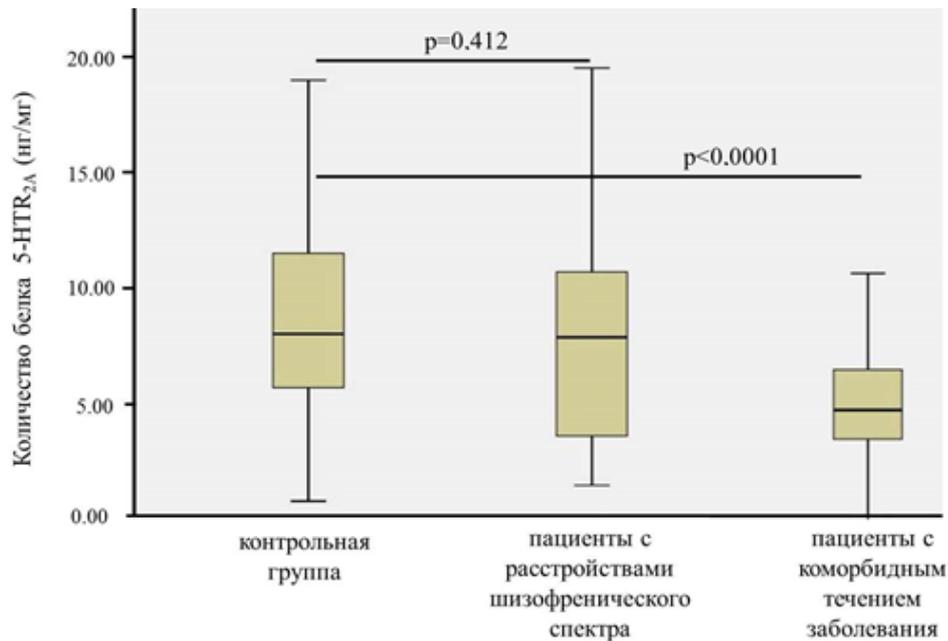


Рисунок 3.2 – Количество белка 5-HT_{2A} в ЛПК у пациентов с психическими патологиями до лечения и лиц контрольной группы

3.1.2. Уровень экспрессии изоформ транскриптов II экзона (E2+, E2-, E2tr) *HTR2A* в зависимости от психического статуса

Было обнаружено повышение уровня мРНК изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* в группе пациентов с РШС по сравнению с контрольной группой: для Etr 1.27(0.74÷1.86) против 0.69(0.38÷1.16), $p=0.007$; E2+ 1.19(0.85÷1.99) в сравнении с 0.69 (0.31÷1.34), $p=0.018$; E2- 1.46(0.90÷2.50) против 0.73(0.35÷1.16), $p < 0.0001$, рисунок 3.3. При коморбидном течении РШС с САЗ достоверное увеличение экспрессии по сравнению с контрольной группой отмечалось для конститутивной изоформы E2+ (уровень составил 3.35 (1.42÷9.26), $p < 0.0001$) и альтернативной изоформы E2- (6.27 (2.71÷12.26), $p < 0.0001$), причем показатели экспрессии были достоверно выше не только по сравнению с группой контроля, но и с группой РШС не отягощенными САЗ.

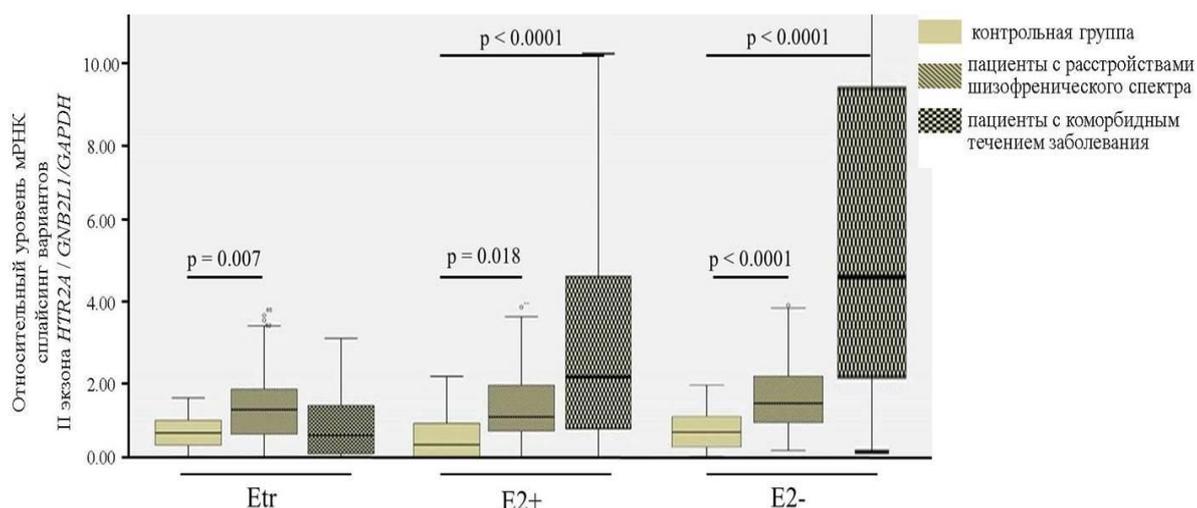


Рисунок 3.3 – Относительный уровень экспрессии изоформ транскриптов экзона II гена *HTR2A* у пациентов с психическими расстройствами и лиц контрольной группы

Кроме того, непараметрический анализ для связанных выборок показал отсутствие статистически значимых различий в уровне экспрессии Etr, E2- и E2+ у здоровых доноров ($p=0.799$), тогда как у пациентов с психическими патологиями паттерн экспрессии был изменен: экспрессия альтернативной изоформы E2- была в 1,3 раза выше, чем конститутивной E2+ в группе РШС без САЗ ($p=0.034$) и в 1,9 раза выше при коморбидном течении РШС с САЗ ($p<0.0001$), (Grunina et al., 2020) рисунок 3.4. Корреляционный анализ Спирмена подтвердил нарушение соотношения изоформ у пациентов с РШС и коморбидным течением заболевания, в то время как в контрольной группе уровень мРНК изоформы E2+ статистически значимо положительно коррелировал как с уровнем мРНК изоформы E2-, так и изоформы Etr (Табл. 3.1).

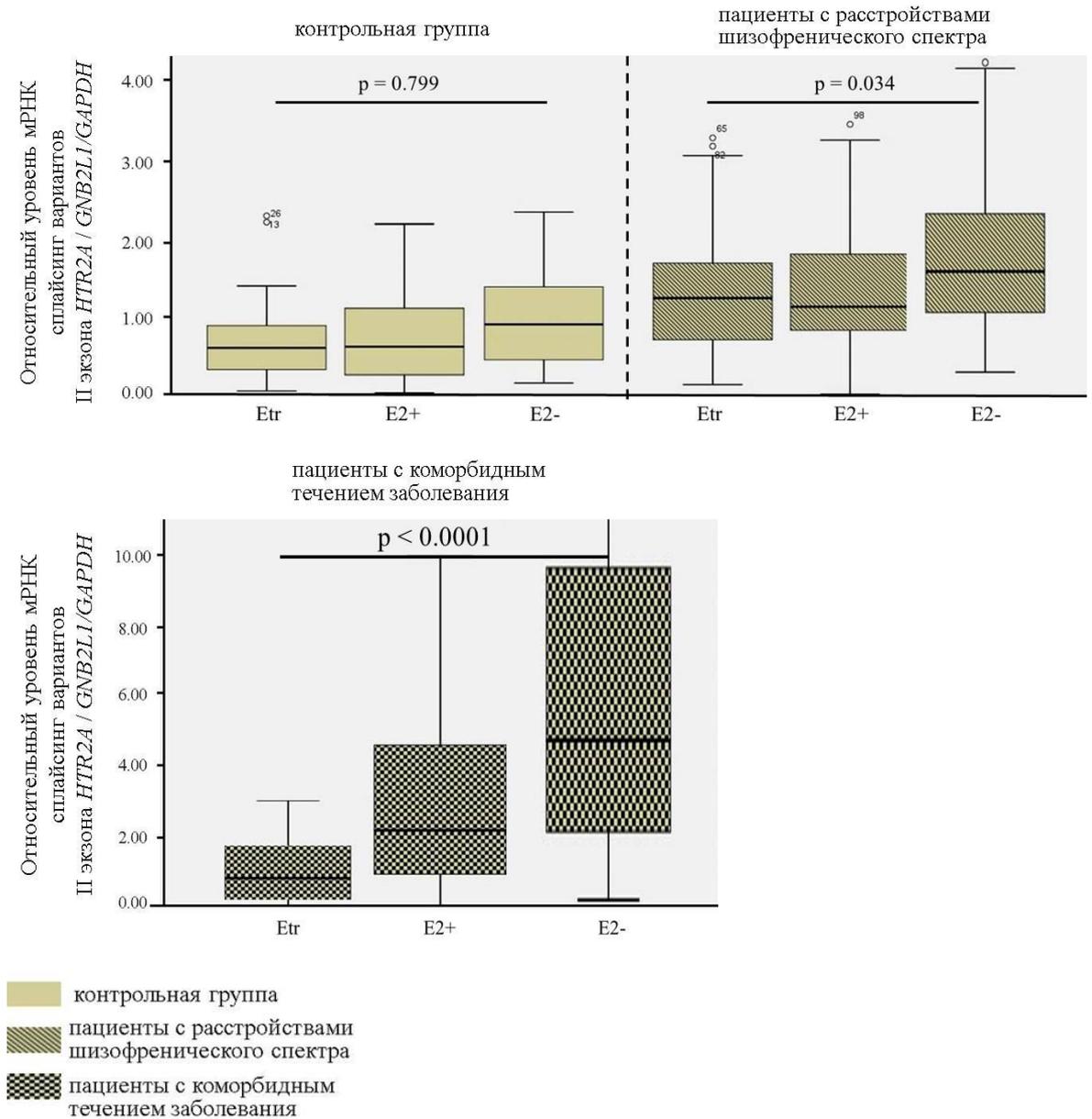


Рисунок 3.4 – Соотношение уровня экспрессии (паттерн) изоформ транскриптов экзона II *HTR2A* в лимфоцитах периферической крови в группах пациентов с психическими расстройствами и контроля

Таблица 3.1 – Корреляционный анализ Спирмена относительного количества мРНК изоформ транскриптов экзона II *HTR2A* психически больных и лиц контрольной группы

	Пациенты с расстройствами шизофренического спектра (n=61)			Пациенты с коморбидным течением заболевания (n=51)			Контрольная группа (n=40)		
	Etr	E2+	E2-	Etr	E2+	E2-	Etr	E2+	E2-
Etr	1.000	.530**	.198 ¹	1.000	.444*	.485**	1.000	.645**	.612**
E2+	.530**	1.000	.531**	.444*	1.000	.339 ²	.645**	1.000	.784**
E2-	.198 ¹	.531**	1.000	.485*	.339 ²	1.000	.612**	.784**	1.000

г – коэффициент корреляции Спирмена
¹p=0.139, ²p=0.16, * p=0.001, **p<0.0001

3.1.3. Распределение генетических вариантов rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* у психически больных и лиц контрольной группы

Распределение частот аллелей по rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* в исследуемых выборках соответствовало равновесию Харди-Вайнберга ($p^2+2pq+q^2=1$):

Пациенты с РСШ: для rs6311 частота аллелей: $p(A)=0.41$, $q(G)=0.59$ ($(0.41)^2+2(0.41*0.59)+(0.59)^2=1$); для rs6313 частота аллелей: $p(C)=0.44$, $q(T)=0.56$ ($(0.44)^2+2(0.44*0.56)+(0.56)^2=0.99$).

Пациенты с коморбидным течением РСШ и САЗ: для rs6311 частота аллелей: $p(A)=0.305$, $q(G)=0.695$ ($(0.305)^2+2(0.305*0.695)+(0.695)^2=1$); для rs6313 частота аллелей: $p(C)=0.285$, $q(T)=0.715$ ($(0.285)^2+2(0.285*0.715)+(0.715)^2=1$).

Контрольная группа: rs6311: $p(A)=0,39$, $q(G)=0,60$
 $(0.39)^2+2(0.39*0.60) +(0.60)^2=0.98$; для rs6313: $p(A)=0.375$, $q(G)=0.625$
 $(0.375)^2+2(0.375*0.625) +(0.625)^2=1$

Статистически значимых различий в частоте встречаемости носителей изучаемых генетических вариантов между группой пациентов с расстройствами шизофренического спектра и группой контроля обнаружено не было, данные представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2 – Распределение генетических вариантов rs6311 и rs6313 *HTR2A* у пациентов с психическими расстройствами и лиц контрольной группы

ОНВ гена <i>HTR2A</i>	Генетические варианты	пациенты с расстройствами шизофренического спектра, (n=61)	Коморбидное течение шизофрении (n=51)	контроль (n=144)	статистики
rs6311 -1438 A>G	AA n (частота)	11 (0.18)	8 (0.16)	26 (0.18)	$1\chi^2=0.259$, $p=0.879$ $2\chi^2=3.801$, $p=0.149$
	AG n (частота)	28 (0.45)	15 (0.29)	60 (0.42)	
	GG n (частота)	22 (0.36)	28 (0.55)	56 (0.39)	
rs6313 102 T>C	TT n (частота)	14 (0.22)	7 (0.14)	21 (0.15)	$1\chi^2=2.199$, $p=0.333$ $2\chi^2=4.612$, $p=0.100$
	TC n (частота)	26 (0.42)	15 (0.29)	65 (0.45)	
	CC n (частота)	21 (0.34)	29 (0.57)	58 (0.40)	

Примечания

1 расстройства шизофренического спектра в сравнении с контролем.

2 коморбидное течение шизофрении в сравнении с контролем.

Анализ сцепления ОПВ rs6311 и rs6313 подтвердил показанную ранее другими авторами (Галактионова с соавт, 2012; Spurlock et al., 1993; Serretti et al. 2007; Smith et al., 2013) высокую степень неравновесия по

сцеплению: для индивидуумов группы контроля показатель неравновесности D' составил 0.98 ($r^2=0.89$), группы психически больных - 0.92 ($r^2=0.7$). Поскольку анализируемые ОПВ для пациентов с психическими расстройствами показали высокую величину неравновесной связи, далее представлены данные только для rs6311.

3.1.4. Влияние генетических вариантов rs6311(rs6313) *HTR2A* на характеристики рецептора 5-НТ_{2A} в группах контроля и пациентов с психическими заболеваниями

В ходе работы было оценено влияние ОПВ rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* на относительный уровень мРНК *HTR2A* и концентрацию белка 5-НТ_{2A} у пациентов с психическими патологиями и лиц контрольной группы. Данные аллельные варианты не влияют на аминокислотную последовательность белка: rs6311 расположен в 5' нетранслируемой области вблизи от промоторного региона гена, полиморфный вариант rs6313 локализован в 1 экзоне (оба аллеля кодируют серин в 34 кодоне). При этом они, по данным литературы, ассоциированы с изменением экспрессии гена и трансляции белка (Serretti et al., 2007; Smith et al., 2013).

Результаты представлены в таблицах 3.3, 3.4 в виде медианы, верхнего и нижнего квартиля ($Me (Lq \div Hq)$) и на рисунке 3.5. Для лиц контрольной группы и пациентов с коморбидным течением психического расстройства с САЗ у носителей различных генетических вариантов rs6311(rs6313) *HTR2A* достоверных различий в количестве белка и уровне экспрессии гена зарегистрировано не было. Для пациентов с РШС в актуальном психическом состоянии (до начала терапии) уровень мРНК также достоверно не различался у носителей различных генетических вариантов rs6311 и rs6313 *HTR2A*, тогда как количество белка рецептора серотонина 2A было выше у носителей варианта AA(TT) по сравнению с гомозиготным вариантом GG(CC) ($p=0.008$) (рис. 3.5).

Таблица 3.3 – Относительный уровень экспрессии *HTR2A* в ЛПК у носителей различных генетических вариантов rs6311*HTR2A*

Изучаемые группы	Генетические варианты rs6311 <i>HTR2A</i>			p, value
	AA	AG	GG	
контроль	1.25 (0.12÷1.93)	0.70 (0.40÷0.81)	0.91 (0.7 ÷1,59)	p=0.313
РШС	0.66 (0.27÷0.98)	0.74 (0.51÷1.27)	0.53 (0.10 ÷1.06)	p=0.501
РШС с САЗ	0.32 (0.12÷0.43)	0.27 (0.02÷0.87)	0.26 (0.04 ÷0.82)	p=0.324

Таблица 3.4 – Количество белка *HTR_{2A}* в ЛПК у носителей различных генетических вариантов rs6311 *HTR2A*

Изучаемые группы	Генетические варианты rs6311 <i>HTR2A</i>			p, value
	AA	AG	GG	
контроль	11.10 (6.37÷13.17)	7.93 (4.82÷11.26)	7.80 (5.79÷11.20)	p=0.628
РШС	10.86 (8.35÷18.19)	8.70 (2.96÷10.82)	5.76 (2.70 ÷8.33)	p=0.008
РШС с САЗ	4.24 (3.95÷5.27)	4.53 (3.12÷6.48)	5.23 (3.44 ÷7.24)	p=0.625

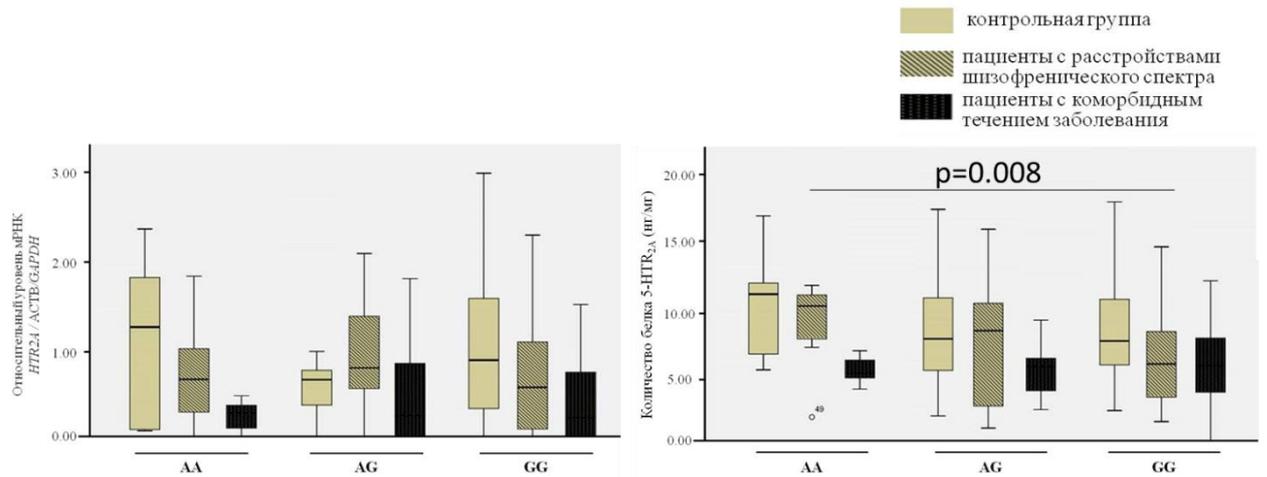


Рисунок 3.5 – Влияние генетических вариантов rs6311 *HTR2A* на изучаемые показатели рецептора 5-НТ_{2А} в группах контроля и пациентов с психическими заболеваниями

Была обнаружена ассоциация носительства генетических вариантов rs6311(rs6313) *HTR2A* с изменением количества белка в группе РШС без САЗ.

В ходе работы также был проведен анализ распределения генетических вариантов rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* как возможных предикторов альтернативного сплайсинга. Результаты представлены в таблице 3.5.

Таблица 3.5 – Уровень экспрессии изоформ мРНК II экзона гена *HTR2A* у носителей различных генетических вариантов rs6311 *HTR2A* пациентов с психическими патологиями и лиц контрольной группы

изоформы региона int1/ex2 гена <i>HTR2A</i>	Исследуемые группы	Генетические варианты rs6311 <i>HTR2A</i>			p (между генотипами), value
		AA	AG	GG	
HTR2A E2tr	контроль	0.58 (0.12±4.07)	0.68 (0.43±1.87)	0.64 (0.36±1.02)	0.582
	РШС	1.26 (0.72±1.94)	1.28 (0.55±1.95)	1.27 (0.77±1.62)	0.976
	РШС с САЗ	0.43 (0.20÷1.08)	0.50 (0.32÷1.38)	1.11 (0.32÷1.48)	0.381
HTR2A E2+	контроль	1.06 (0.22±3.57)	0.68 (0.24±1.72)	0.66 (0.32±1.36)	0.914
	РШС	1.25 (0.93±2.14)	1.33 (0.81±2.01)	1.10 (0.72±1.45)	0.991
	РШС с САЗ	2.87 (1.05÷9.38)	2.25 (0.54÷4.64)	4.10 (1.74÷9.85)	0.387
HTR2A E2-	контроль	0.75 (0.29±1.43)	0.41 (0.30±1.18)	0.75 (0.40±1.22)	0.852
	РШС	1.49 (0.82±4.33)	1.48 (0.95±2.44)	1.41 (0.87±2.42)	0.489
	пациенты с РШС с САЗ	4.77 (2.48÷16.73)	8.66 (2.86÷11.86)	5.89 (2.67÷12.20)	0.988

В настоящее время высказываются предположения о возможном влиянии rs6311 и rs6313 на процесс альтернативного сплайсинга гена *HTR2A* (Smith et al., 2013, 2014). Достоверных отличий в уровне мРНК изучаемых вариантов сплайсинга между носителями разных генетических вариантов у лиц контрольной группы, так же, как и для пациентов с психическими расстройствами получено не было.

Таким образом, не было показано влияние изучаемых ОПВ на процесс альтернативного сплайсинга изоформ транскриптов второго экзона гена *HTR2A* в лимфоцитах периферической крови.

3.2. Изменение показателей рецептора 5-НТ_{2А} (экспрессия мРНК гена *HTR2A*, мРНК изоформ транскриптов II экзона (E2+, E2-, E2tr) *HTR2A*, концентрации белка) на фоне антипсихотической терапии у пациентов с психическими расстройствами

3.2.1. Влияние терапии оланзапином и галоперидолом на относительный уровень экспрессии *HTR2A* и количество белка 5-НТ_{2А}

Терапия антипсихотическими лекарственными средствами (оланзапин, галоперидол) в течение 28 дней не оказывала влияния на относительный уровень экспрессии *HTR2A* в ЛПК (Taraskina et al., 2017). При терапии галоперидолом для пациентов с РШС показатели относительного количества мРНК оставались стабильными: до терапии составили 0.65 (0.24÷1.27), через 28 дней воздействия препарата – 0.64 (0.36÷1.42), $p=0.655$. При терапии оланзапином уровень экспрессии гена *HTR2A* снизился с начального 0.70 (0.22÷1.31) до 0.43 (0.14÷1.24), не достигнув статистически значимых различий ($p=0.670$), рисунок 3.6 (А). В группе пациентов с коморбидным течением заболевания (РШС с САЗ) показатели составили: при терапии галоперидолом – 0.29 (0.07÷0.97) и 0.61 (0.31÷1.12), терапии оланзапином – 0.32 (0.04÷0.63) и 0.23 (0.09÷0.62), в актуальном психическом состоянии и на 28 день приема препарата, соответственно (рисунок 3.6 (В)).

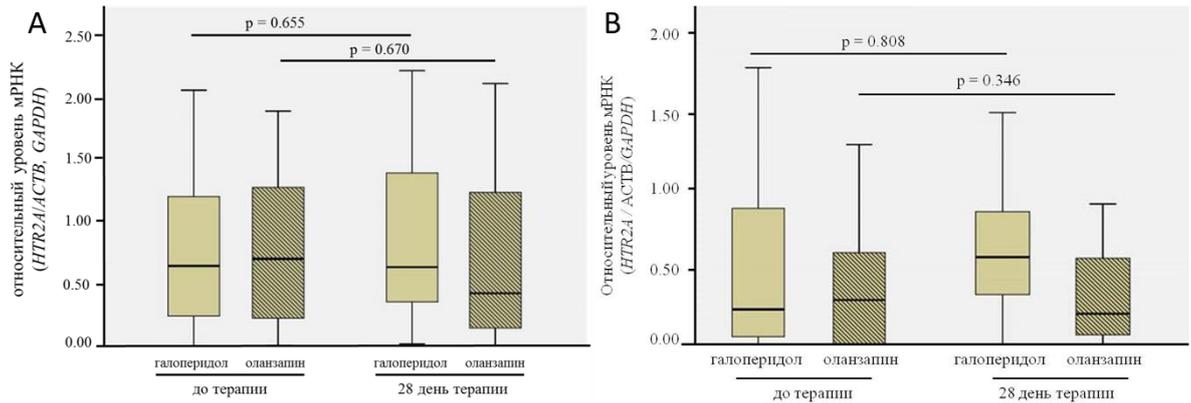


Рисунок 3.6 – Относительный уровень экспрессии гена *HTR2A* в ЛПК на фоне фармакотерапии. А – пациенты с РШС; В – пациенты с коморбидным течением РШС с САЗ.

При изучении количества белка рецептора 5-НТ_{2А} в ЛПК у психически больных на фоне 28 дней терапии антипсихотическими препаратами были получены следующие данные:

В группе пациентов с РШС при терапии галоперидолом статистически значимых различий в значениях до и после терапии обнаружено не было ($p=0.083$), показатели составили: 8.16 (2.80÷11.03) нг/мг до терапии и 6.43 (4.23÷7.89) нг/мг – на 28-й день приема препарата. При этом, при приеме оланзапина в течение 28 дней происходило статистически значимое снижение количества белка с базового уровня (стадия острого психоза): с 7.82 (5.16÷10.00) нг/мг до 3.99 (2.30÷6.39) нг/мг, $p < 0.001$, рисунок 3.7(А) (Белинская с соавт, 2017).

В группе пациентов с коморбидным течением РШС с САЗ при нормализации психического статуса наблюдалось снижение количества белка 5-НТ_{2А} в ЛПК при терапии как галоперидолом, так и оланзапином. При лечении галоперидолом показатели составили 4.91 (3.11÷6.80) и 0.31 (0.15÷5.49) нг/мг, до и на 28-й день приема, соответственно ($p=0.025$), при терапии оланзапином – 4.47 (4.06÷6.45) нг/мг и 0.67 (0.44÷2.04) нг/мг, соответственно ($p=0.025$), рисунок 3.7(В).

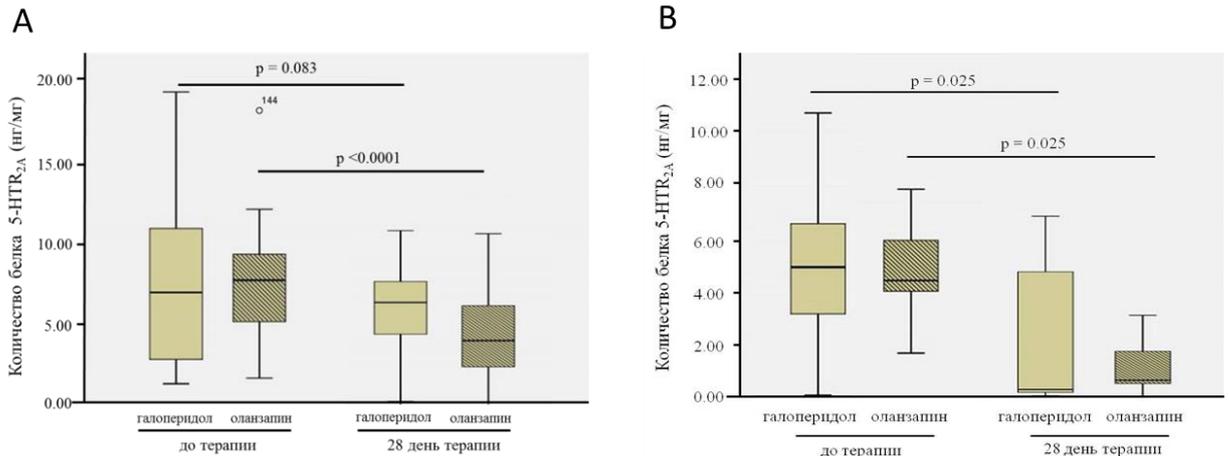


Рисунок 3.7 – Изменение концентрации белка 5-НТ_{2А} в ЛПК на фоне антипсихотической терапии. А – пациенты с РШС; В – пациенты с коморбидным течением РШС с САЗ.

Снижение количества белка 5-НТ_{2А}, преимущественно при терапии оланзапином, вероятно, связано с большей аффинностью препарата именно к данному рецептору. Поскольку не наблюдалось изменения относительного уровня мРНК *HTR2A* на фоне антипсихотической терапии, можно предположить, что изменение происходило только на уровне количества зрелого белка или при трансляции рецептора (Тараскина с соавт., 2018). Снижение количества рецептора 5-НТ_{2А} без ингибирования процесса транскрипции гена можно объяснить активацией альтернативного сигнального пути с участием GSK-3 β и β -аррестина с последующей интернализацией рецепторов в эндосомы. Десенсibilизация и интернализация сопряженных с G-белками рецепторов под действием препаратов, являющихся агонистами рецепторов имеют клиническое значение и влияет на терапевтический эффект (Raote et al., 2013).

3.2.2. Относительный уровень мРНК *HTR2A* и концентрация белка рецептора 5-HT_{2A} у носителей различных генетических вариантов rs6311(rs6313) *HTR2A* на фоне антипсихотической терапии

Изменение относительного уровня мРНК *HTR2A* на фоне антипсихотической терапии в зависимости от носительства генетических вариантов rs6311(rs6313) *HTR2A* представлено в таблице 3.6 и рисунке 3.8. Генетический вариант AA(ТТ) rs6311(rs6313) *HTR2A* был ассоциирован с статистически значимым снижением относительного уровня экспрессии *HTR2A* у пациентов с РШС на фоне терапии оланзапином: 0.66 (0.27÷0.98) в сравнении с 0.002 (0.001÷0.63), $p=0.025$. В группе пациентов с коморбидным течением РШС с САЗ, получавших терапию галоперидолом, не было выявлено носителей генетического варианта AA(ТТ) rs6311(rs6313) *HTR2A*.

Таблица 3.6 – Значения мРНК в группах пациентов с психическими расстройствами, носителей различных генетических вариантов rs6311 *HTR2A* до терапии и через 28 дней лечения антипсихотическими препаратами.

Изучаемые группы	Генетические варианты rs6311 <i>HTR2A</i>			P, значение
	AA	AG	GG	
РШС_V1	0.66 (0.27÷0.98)	0.74 (0.51÷1.27)	0.53 (0.10 ÷1.06)	0.501
РШС_V2 (галоперидол)	0.37 (0.28÷1.05)	0.61 (0.02÷1.34)	0.47 (0.30 ÷1.17)	0.939
РШС_V2 (оланзапин)	0.002 (0.001÷0.63)	0.53 (0.16÷1.24)	0.12 (0.04 ÷1.21)	0.087
РШС САЗ_V1 ^c	0.32 (0.12÷0.43)	0.27 (0.02÷0.87)	0.26 (0.04 ÷0.82)	0.924
РШС САЗ_V2 (галоперидол) ^c	-	0.66 (0.24÷1.52)	0.51 (0.34 ÷1.01)	0.845
РШС САЗ_V2 (оланзапин) ^c	0.12 (0.05÷0.78)	0.27 (0.09÷0.33)	0.34 (0.15 ÷0.79)	0.469

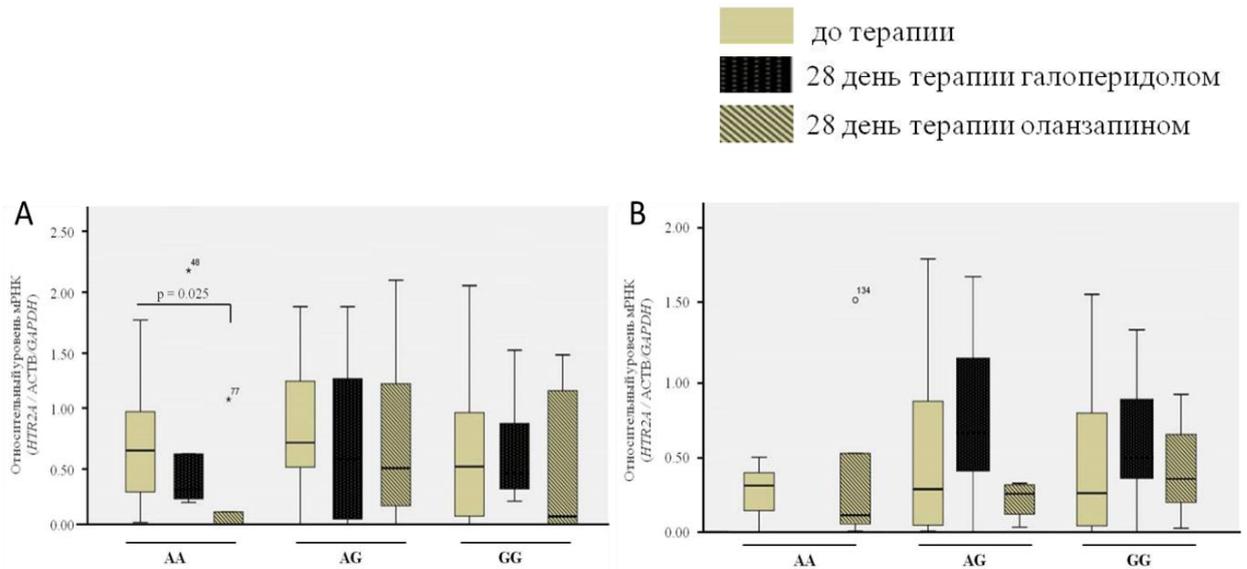


Рисунок 3.8 – Относительный уровень экспрессии гена *HTR2A* у носителей различных генетических вариантов rs6311 гена *HTR2A* на фоне терапии антипсихотиками. А – пациенты с РШС; В – пациенты с коморбидным течением РШС с САЗ.

На фоне антипсихотической терапии в течение 28 дней изменение концентрации белка было ассоциировано с носительством различных генетических вариантов rs6311 (rs6313) *HTR2A*. Было показано достоверное снижение этого показателя у пациентов с генетическим вариантом AA, как при терапии галоперидолом, так и при терапии оланзапином: с 10.9 нг/мг (10.3÷21.7) до 6.2 нг/мг (5.3÷6.2), $p=0.014$, и с 8.3 нг/мг (4.5÷14.9) до 1.8 нг/мг (0.5÷6.3), $p=0.007$, соответственно. У пациентов с генетическим вариантом AG также наблюдалось статистически значимое снижение количества белка 5-НТ_{2А} при терапии оланзапином с 9.1 (7.2÷10.6) до 5.1 (3.1÷8.4), $p=0.008$. Антипсихотическая терапия у носителей гомозиготного варианта GG rs6311 не оказывала статистически значимого влияния на количество белка 5-НТ_{2А} в лимфоцитах периферической крови (рисунок 3.9). Изменение концентрации белка 5-НТ_{2А} в ЛПК пациентов с психическими

расстройствами оценивалось в общей группе пациентов с расстройствами шизофренического спектра (Заботина с соавт, 2018).

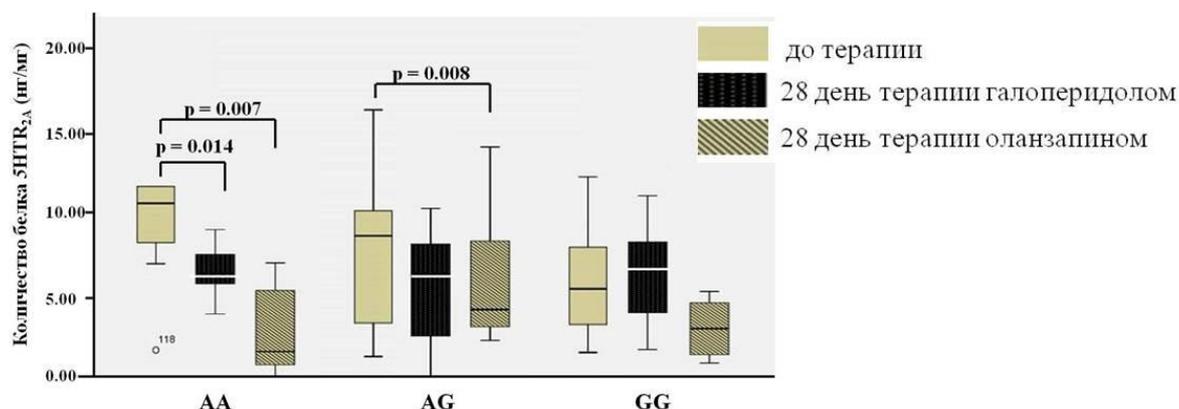


Рисунок 3.9 – Концентрация белка 5-НТ_{2А} в ЛПК у носителей различных генетических вариантов rs6311 *HTR2A* на фоне терапии антипсихотическими препаратами (общая группа пациентов)

3.2.3. Относительный уровень мРНК изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* на фоне антипсихотической терапии

28 дней терапии как оланзапином, так и галоперидолом не оказывали влияния на уровень мРНК изучаемых вариантов сплайсинга (E2+, E2tr, E2-) гена *HTR2A* (данные представлены на рисунке 3.10 и в таблице 3.7).

Таблица 3.7 – Показатели относительного уровня экспрессии изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* у пациентов с психическими патологиями

РШС			РШС с САЗ		
До терапии	Терапия галоперидолом	Терапия оланзапином	До терапии	Терапия галоперидолом	Терапия оланзапином
1.27 (0.74÷1.86)	1.34 (0.75÷1.59)	1.41 (0.72÷2.21)	0.72 (0.32÷1.38)	0.42 (0.14÷1.65)	0.97 (0.35÷1.35)
1.19 (0.85÷1.99)	1.12 (0.38÷1.76)	1.19 (0.60÷2.60)	3.35 (1.42÷9.26)	4.18 (0.21÷7.35)	1.94 (0.47÷6.19)
1.46 (0.90÷2.50)	1.33 (0.48÷2.17)	1.12 (0.58÷2.78)	6.27 (2.71÷12.26)	10.28 (1.55÷17.14)	5.27 (1.99÷10.21)

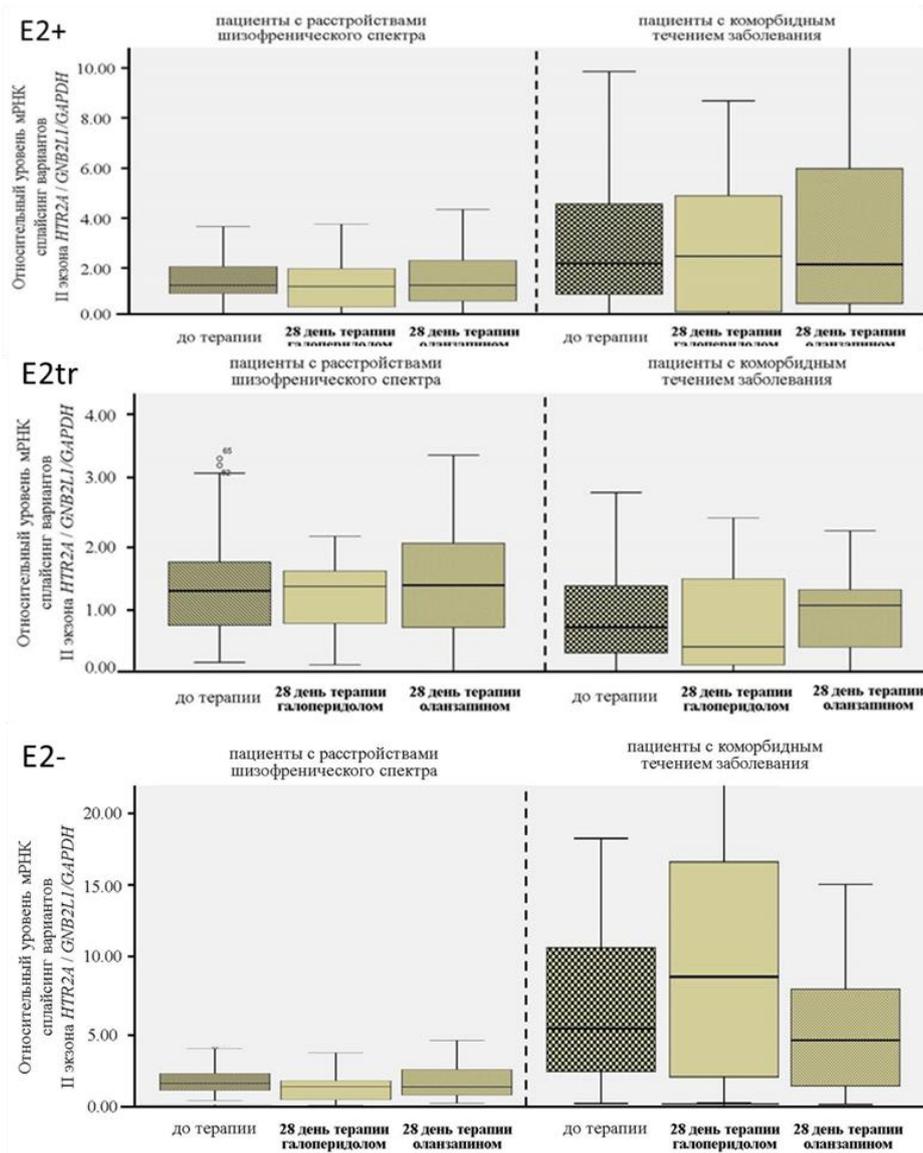


Рисунок 3.10 – Изменение относительного уровня мРНК изоформ транскриптов II экзона *HTR2A* (E2+, E2tr, E2-) в группах пациентов с психическими расстройствами на фоне антипсихотической терапии

Таким образом, было показано, что при улучшении психического состояния пациентов уровень экспрессии изучаемых изоформ (E2+, E2tr, E2-) не изменялся.

Была также определена динамика изменения уровня экспрессии изучаемых изоформ (E2+, E2tr, E2-) на фоне антипсихотической терапии в зависимости от генетических вариантов rs6311 (rs6313) *HTR2A*. (Таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Уровень экспрессии изоформ мРНК II экзона гена *HTR2A* у носителей различных генетических вариантов rs6311 *HTR2A* пациентов с психическими патологиями

изоформы региона int1/ex2 гена <i>HTR2A</i>	Исследуемые группы	Генетические варианты rs6311 <i>HTR2A</i>		
		AA	AG	GG
<i>HTR2A E2tr</i>	пациенты РШС V1	с 1.26 (0.72±1.94)	1.28 (0.55±1.95)	1.27 (0.77±1.62)
	пациенты РШС V2	с 1.08 (0.83±1.38)	1.48 (0.78±1.84)	1.26 (0.71±1.88)
	р (между визитами), value	0.206	0.433	0.513
<i>HTR2A E2+</i>	пациенты РШС V1	с 1.25 (0.93±2.14)	1.33 (0.81±2.01)	1.10 (0.72±1.45)
	пациенты РШС V2	с 0.80 (0.24±1.84)	1.24 (0.55±2.34)	1.19 (0.66±1.88)
	р (между визитами), value	0.317	0.542	0.655
<i>HTR2A E2-</i>	пациенты РШС V1	с 1.49 (0.82±4.33)	1.48 (0.95±2.44)	1.41 (0.87±2.42)
	пациенты РШС V2	с 0.77 (0.33±3.33)	1.25 (0.84±2.41)	1.30 (0.55±2.06)
	р (между визитами), value	0.317	0.841	0.513
<i>HTR2A E2tr</i>	РШС с СА3 V1	0.43 (0.20÷1.08)	0.50 (0.32÷1.38)	1.11 (0.32÷1.48)
	РШС с СА3 V2	0.52 (0.37÷1.53)	0.77 (0.15÷1.52)	0.92 (0.17÷1.43)
	р (между визитами), value	0.705	0.248	0.317
<i>HTR2A E2+</i>	РШС с СА3 V1	2.87 (1.05÷9.38)	2.25 (0.54÷4.64)	4.10 (1.74÷9.85)
	пациенты РШС с СА3 V2	с 1.23 (0.34÷6.02)	2.05 (0.17÷8.13)	4.13 (1.71÷5.92)
	р (между визитами), value	0.157	0.782	0.394
<i>HTR2A E2-</i>	пациенты РШС с СА3 V1	с 4.77 (2.48÷16.73)	8.66 (2.86÷11.86)	5.89 (2.67÷12.20)
	пациенты РШС с СА3 V2	с 11.06 (2.28÷29.20)	6.11 (2.97÷12.34)	6.70 (0.96÷15.31)
	р (между визитами), value	0.480	0.564	0.394

Несмотря на то, что в общей группе пациентов с РШС (без деления на подгруппы по фармакотерапии) различий в изменении уровня экспрессии вариантов спайсинга гена *HTR2A* на фоне воздействия антипсихотических препаратов зарегистрировано не было (см.таблицу 3.8), при делении пациентов на подгруппы в зависимости от принимаемого препарата, через 28 дней терапии оланзапином (препаратом с высоким аффинитетом к рецептору 5-НТ_{2А}) было показано снижение количества мРНК альтернативной изоформы с пропущенным экзоном E2- с 1.7 (1.04÷4.82) до 0.4 (0.24÷1.96), $p=0.025$ именно у носителей генетического варианта AA rs6311, а также с 2.30 (1.62±5.78) до 0.58 (0.33±3.34), $p=0.008$ у носителей генетического варианта TT rs6313. При терапии галоперидолом не было обнаружено ассоциации носительства ОПВ rs6311 (rs6313) с изменением относительного уровня экспрессии изоформ транскриптов второго экзона гена *HTR2A* (Рисунок 3.11, данные приведены для rs6311).

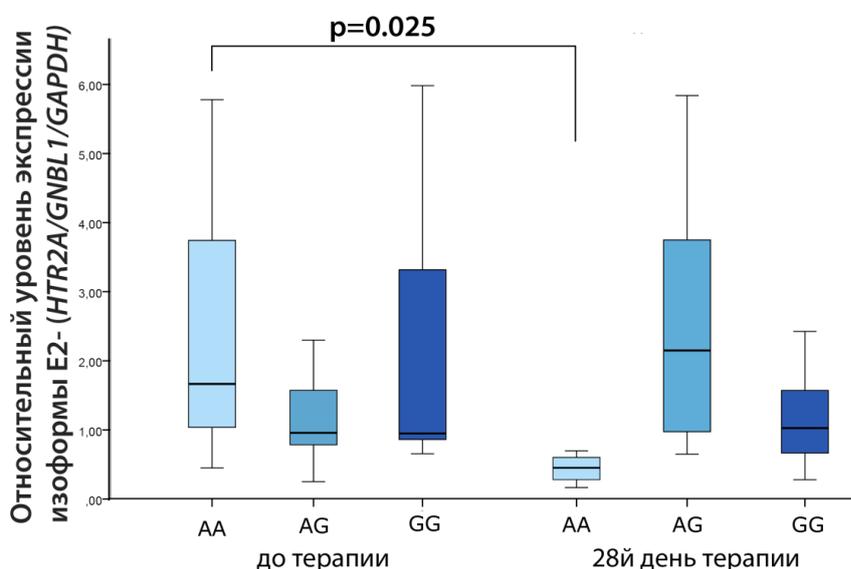


Рисунок 3.11 – Относительный уровень экспрессии изоформы E2-гена *HTR2A* у пациентов с РШС, носителей различных генетических вариантов rs6311 *HTR2A* на фоне терапии оланзапином.

3.3 Определение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β), активированного TGF- β 1 в сыворотке крови как характеристика системного воспаления при психических заболеваниях

Уровень секреции цитокинов в стадии острого психоза (до начала фармакологической коррекции) у пациентов с расстройствами шизофренического спектра превышал референсные значения для здоровых доноров и составил (в пг/мл) для IL-1 β 8.50 (6.69÷9.40), IL-6 – 8.07 (6.93÷10.42), TGF- β 1 - 572.39 (459.66÷755.39) (рис. 3.12).

Ранее было показано, что повышенная продукция цитокинов IL-6, IL-1 β и TGF- β 1, ассоциированная с первым психотическим эпизодом, нормализовалась при проведении антипсихотической терапии, в частности, рисперидоном (Miller et al., 2011; Tourjman et al., 2013). В ходе данного исследования, терапия в течение четырех недель как галоперидолом, так и оланзапином незначительно влияла на продукцию IL-1 β , IL-6 и TGF- β 1 в сыворотке крови, достоверность различий показателей между визитами составила: $p=0.257$, $p=0.637$, $p=0.206$ и $p=0.739$, $p=0.998$, $p=0.527$, на фоне действия галоперидола и оланзапина, соответственно. (Тараскина с соавт, 2018) При этом, из-за разнонаправленного действия антипсихотиков I и II поколения на продукцию TGF- β 1, между показателями концентрации данного цитокина в сыворотке крови пациентов в группах, различающихся по фармакотерапии, достигались статистически значимые различия ($p = 0.009$) (рис. 3.12).

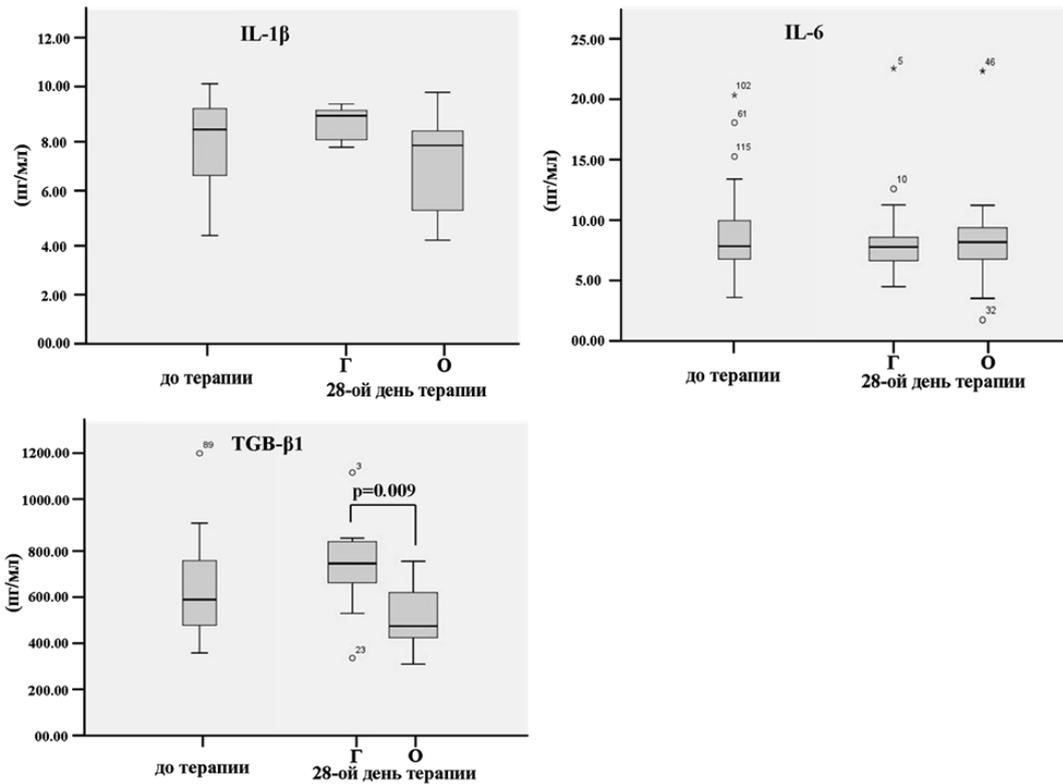


Рисунок 3.12 – Концентрация интерлейкинов (IL)-1 β , IL-6 и трансформирующего ростового фактора (TGF)- β 1 в сыворотке крови у пациентов с РШС на фоне антипсихотической терапии (Г – галоперидолом, О – оланзапином)

Незначительные перестройки в профилях провоспалительных цитокинов можно объяснить коротким сроком наблюдения пациентов, недостаточным для нормализации иммунного ответа и, возможно, механизмом воздействия препаратов.

3.4 Ассоциация ответа пациентов с психическими расстройствами на терапию с изучаемыми характеристиками рецептора 5-HT_{2A}

3.4.1 Эффективность антипсихотической терапии

По результатам психометрического обследования на фоне фармакотерапии пациенты с психическими расстройствами были разделены на подгруппы по эффективности применяемой терапии. При редукции суммарной шкалы PANSS равной или более 20% за 28 дней терапии (клинически значимая положительная динамика психического

статуса) пациентов относили в подгруппу эффективной терапии, при изменении менее, чем на 20% суммарной шкалы PANSS от начального показателя – в подгруппу малоэффективной терапии. В подгруппу эффективной терапии вошли 72 пациента, соответственно в подгруппу малоэффективной терапии – 33 пациента.

Эффективная терапия в группе пациентов с психическими патологиями (снижение общего балла по шкале PANSS $\geq 20\%$) была ассоциирована с высокими значениями уровня мРНК альтернативной изоформы E2- (3.14 (1.62÷7.91 vs 1.54 (0.95÷3.20), $p=0.018$) (независимо от препарата) (Грунина с соавт, 2020) (Таблица 3.9), и при терапии галоперидолом с генетическим вариантом GG rs6311 vs AA+AG ($\chi^2=4.583$, $p=0.033$) (Таблица 3.9).

Таблица 3.9 – Ассоциация эффективности терапии с изучаемыми молекулярно-генетическими характеристиками рецептора 5-HT_{2A}

Изучаемые характеристики рецептора 5-HT _{2A}	Редукция шкалы PANSS $\geq 20\%$ Эффективная (n=72)	Редукция шкалы PANSS $< 20\%$ Малоэффективная (n=33)	Критерий U Манна-Уитни, p
Уровень мРНК <i>HTR2A</i>	0.35 (0.12÷0.88)	0.65 (0.14÷1.31)	0.109
Количество белка 5-HT _{2A}	4.95 (3.46÷8.21)	6.88 (3.05÷10.60)	0.259
Уровень мРНК <i>HTR2A Etr</i>	0.92 (0.39÷1.52)	1.18 (0.74÷1.87)	0.193
Уровень мРНК <i>HTR2A E2+</i>	1.98 (0.88÷4.13)	1.27 (0.92÷2.20)	0.242
Уровень мРНК <i>HTR2A E2-</i>	3.14 (1.62÷7.91)	1.54 (0.95÷3.20)	0.018

Таблица 3.10 – Распределение генетических вариантов rs6311 *HTR2A* в подгруппах пациентов, сформированных по эффективности антипсихотической терапии

Генотипы rs6311 гена 5- <i>HTR2A</i>	терапия галоперидолом		терапия оланзапином	
	редукция шкалы PANSS		редукция шкалы PANSS	
	≥ 20% (n=35)	< 20% (n=20)	≥ 20% (n=39)	< 20% (n=14)
AA+AG n (частота)	14 (0.40)	14 (0.70)	23 (0.59)	8 (0.57)
GG n (частота)	21 (0.60)	6 (0.30)	16 (0.41)	6 (0.43)
Статистики	$\chi^2=4.583$, p=0.033 OR=0.29, 95%CI (0.09-0.92)		$\chi^2=0.014$, p=0.906	

Несмотря на установленную причинно-следственную ассоциацию между уровнем провоспалительных цитокинов и развитием острых психозов, в том числе, расстройств шизофренического спектра (Miller et al., 2011; Tourjman et al., 2013; Cai et al., 2016), наличие корреляционных связей между концентрациями сывороточных цитокинов и выраженностью психотических симптомов (позитивной, негативной, общей психопатологической) остаются спорным вопросом (Khandaker et al., 2015), по всей видимости, это связано с гетерогенностью дизайна проводимых исследований (одномоментное/лонгитюдное), клинического статуса пациента (первый психотический эпизод, острый рецидив, резистентность к антипсихотической терапии), фармакотерапевтического фона (до начала терапии, продолжительности антипсихотического воздействия, выбора препарата).

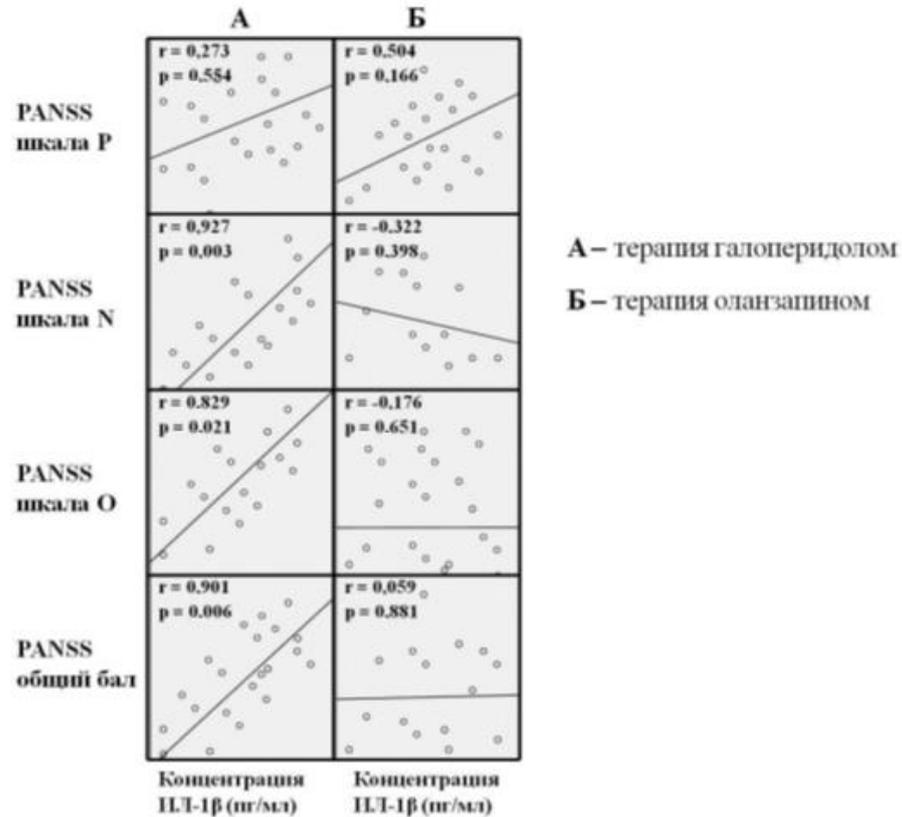


Рисунок 3.13 – Матрица диаграмм рассеивания. Корреляционный анализ Спирмена между значениями подшкал PANSS и концентрацией IL-1 β в сыворотке крови на фоне антипсихотической терапии (28 день) (r – коэффициент корреляции Спирмена)

В ходе данного исследования на 28 день терапии галоперидолом регистрировались корреляционные взаимосвязи показателей подшкал PANSS, отражающих выраженность негативных и общих психопатологических симптомов, с концентрацией IL-1 β в сыворотке крови (Насырова с соавторами, 2016). Отсутствие подобной корреляции при терапии оланзапином, вероятно, определяется гетерогенностью терапевтического действия типичных и атипичных нейролептиков на различные домены психотической симптоматики. То есть, высокая концентрация IL-1 β соотносилась с показателями шкал, отражающих психическое здоровье, менее подвергнутых коррекции антипсихотической терапии.

3.4.2. Развитие побочных эффектов терапии

Поскольку терапия антипсихотическими препаратами зачастую сопровождается появлением нежелательных явлений, снижающих качество жизни и приводящих к отказу от дальнейшего лечения, были проанализированы наиболее часто возникающие побочные эффекты: экстрапирамидные (акатизия, паркинсонизм), а также антипсихотик-индуцированный набор веса, являющийся первым признаком метаболических нарушений при воздействии терапии. При этом, набор массы тела запускает последующие эндокринные нарушения.

Развитие экстрапирамидных симптомов оценивали при помощи шкал Simpson Angus Scale (SAS) и Barnes Akathisia Rating Scale (BARS). Диагноз «Акатизия» ставился при значениях шкалы BARS 2 и более, Паркинсонизм – при значениях шкалы SAS 3 и более. Антипсихотик-индуцированный набор массы тела диагностировался в случае прибавки массы тела пациента больше чем на 7% от начального за 28 дней приема антипсихотических препаратов.

Антипсихотик-индуцированный набор массы тела на фоне антипсихотической терапии не был ассоциирован с изучаемыми характеристиками рецептора 5-HT_{2A} в лимфоцитах периферической крови (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 – Распределение молекулярно-генетических параметров рецептора 5-НТ_{2А} в группах, различающихся по набору веса на фоне антипсихотической терапии

Изучаемые характеристики рецептора 5-НТ _{2А}	Набор веса ≥ 7% (n=18)	Набор веса < 7% (n=80)	Критерий U Манна-Уитни, p
Уровень мРНК <i>HTR2A</i>	0.62 (0.10÷0.91)	0.52 (0.15÷1.00)	0.749
Количество белка 5-НТ _{2А}	4.36 (4.05÷6.28)	6.40 (3.44÷9.27)	0.098
Уровень мРНК <i>HTR2A Etr</i>	0.75 (0.37÷1.32)	1.10 (0.41÷1.60)	0.522
Уровень мРНК <i>HTR2A E2+</i>	2.06 (1.05÷2.62)	1.50 (0.86÷4.09)	0.756
Уровень мРНК <i>HTR2A E2-</i>	2.88 (1.10÷7.50)	2.56 (1.16÷6.79)	0.944

При этом, антипсихотик-индуцированная акатизия в выборке пациентов с РШС без САЗ соотносилась с низкими показателями уровня экспрессии изучаемых изоформ (для Etr: 0.51(0.36÷0.78) в сравнении с 1.29(0.78÷1.92), p=0.011; для E2+: 0.68 (0.21÷0.90) по сравнению с 1.28 (0.96÷2.02), p=0.011; для E2- 0.59 (0.36÷1.07) против 1.51(0.94÷2.94), p=0.017), таблица 3.12.

У пациентов с расстройствами шизофренического спектра, неотягощенных синдромом алкогольной зависимости, ассоциаций между изучаемыми характеристиками рецептора 5-НТ_{2А} и развитием паркинсонизма не наблюдалось (таблица 3.13). При коморбидном течении РШС с САЗ была показана ассоциация более низких значений уровней мРНК и белка рецептора серотонина 2А до лечения с отсутствием развития паркинсонизма (таблица 3.13).

Таблица 3.12 – Ассоциация развития акатизии с изучаемыми характеристиками рецептора 5-HT_{2A}

	Изучаемые характеристики рецептора 5-HT _{2A}	Наличие акатизии BARS ≥2	Отсутствие акатизии BARS <2	Критерий U Манна-Уитни, p
пациенты с расстройствами шизофренического спектра		(n=7)	(n=53)	
	Уровень мРНК <i>HTR2A</i>	0.40 (0.13 ÷ 0.40)	0.65 (0.25 ÷ 1.22)	0.480
	Количество белка 5-HT _{2A}	6.53 (2.42 ÷ 10.25)	7.99 (3.68 ÷ 11.00)	0.621
	Уровень мРНК <i>HTR2A Etr</i>	0.51 (0.36 ÷ 0.78)	1.29 (0.78 ÷ 1.92)	0.011
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2+</i>	0.68 (0.21 ÷ 0.90)	1.28 (0.96 ÷ 2.02)	0.011
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2-</i>	0.59 (0.36 ÷ 1.07)	1.51 (0.94 ÷ 2.94)	0.017
пациенты с коморбидным течением заболевания		(n=8)	(n=30)	
	Уровень мРНК <i>HTR2A</i>	0.22 (0.05 ÷ 0.66)	0.28 (0.03 ÷ 0.85)	0.889
	Количество белка 5-HT _{2A}	5.83 (2.71 ÷ 8.62)	4.91 (3.96 ÷ 6.36)	0.685
	Уровень мРНК <i>HTR2A Etr</i>	0.80 (0.20 ÷ 1.48)	1.07 (0.34 ÷ 1.47)	0.957
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2+</i>	4.10 (1.15 ÷ 6.85)	3.56 (1.47 ÷ 9.63)	0.958
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2-</i>	6.95 (2.92 ÷ 13.19)	6.54 (2.40 ÷ 12.25)	0.731

Таблица 3.13 – Ассоциация развития паркинсонизма с молекулярно-генетическими характеристиками рецептора 5-НТ_{2А}

	Исследуемые характеристики рецептора 5-НТ _{2А}	Наличие паркинсонизма SAS ≥3	Отсутствие паркинсонизма SAS <3	Критерий U Манна-Уитни, p
пациенты с расстройствами психического спектра		(n=25)	(n=32)	
	Уровень мРНК <i>HTR2A</i>	0.65 (0.25÷1.02)	0.70 (0.18÷1.36)	0.660
	Количество белка 5-НТ _{2А}	5.87 (2.77÷10.34)	8.52 (5.80÷11.76)	0.098
	Уровень мРНК <i>HTR2A Etr</i>	1.28 (0.64÷1.74)	1.27 (0.75÷2.01)	0.778
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2+</i>	1.25 (0.82÷1.87)	1.24 (0.93÷2.08)	0.773
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2-</i>	1.46 (0.86÷2.26)	1.36 (0.88÷3.32)	0.942
пациенты с коморбидным течением заболевания		(n=12)	(n=26)	
	Уровень мРНК <i>HTR2A</i>	0.51 (0.26 ÷ 1.29)	0.15 (0.02 ÷ 0.61)	0.026
	Количество белка 5-НТ _{2А}	6.88 (5.65 ÷ 8.85)	4.46 (3.14 ÷ 5.10)	0.001
	Уровень мРНК <i>HTR2A Etr</i>	0.84 (0.46 ÷ 1.75)	0.89 (0.26 ÷ 1.39)	0.441
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2+</i>	4.10 (1.62 ÷ 8.28)	3.56 (1.40 ÷ 9.65)	1.000
	Уровень мРНК <i>HTR2A E2-</i>	6.00 (2.12 ÷ 12.39)	6.84 (2.98 ÷ 13.25)	0.402

При этом, отмеченная выше редукция количества белка рецептора серотонина 2А в лимфоцитах периферической крови была показана только в случаях безопасной терапии, а при развитии нежелательных явлений (как набора веса, так и развития экстрапирамидных симптомов) снижения количества рецептора 5-НТ_{2А} не происходило, что согласуется с предположением участия процессов интернализации рецепторов с возможным развитием негативных побочных эффектов, (Заботина с соавт, 2020) рисунок 3.14.

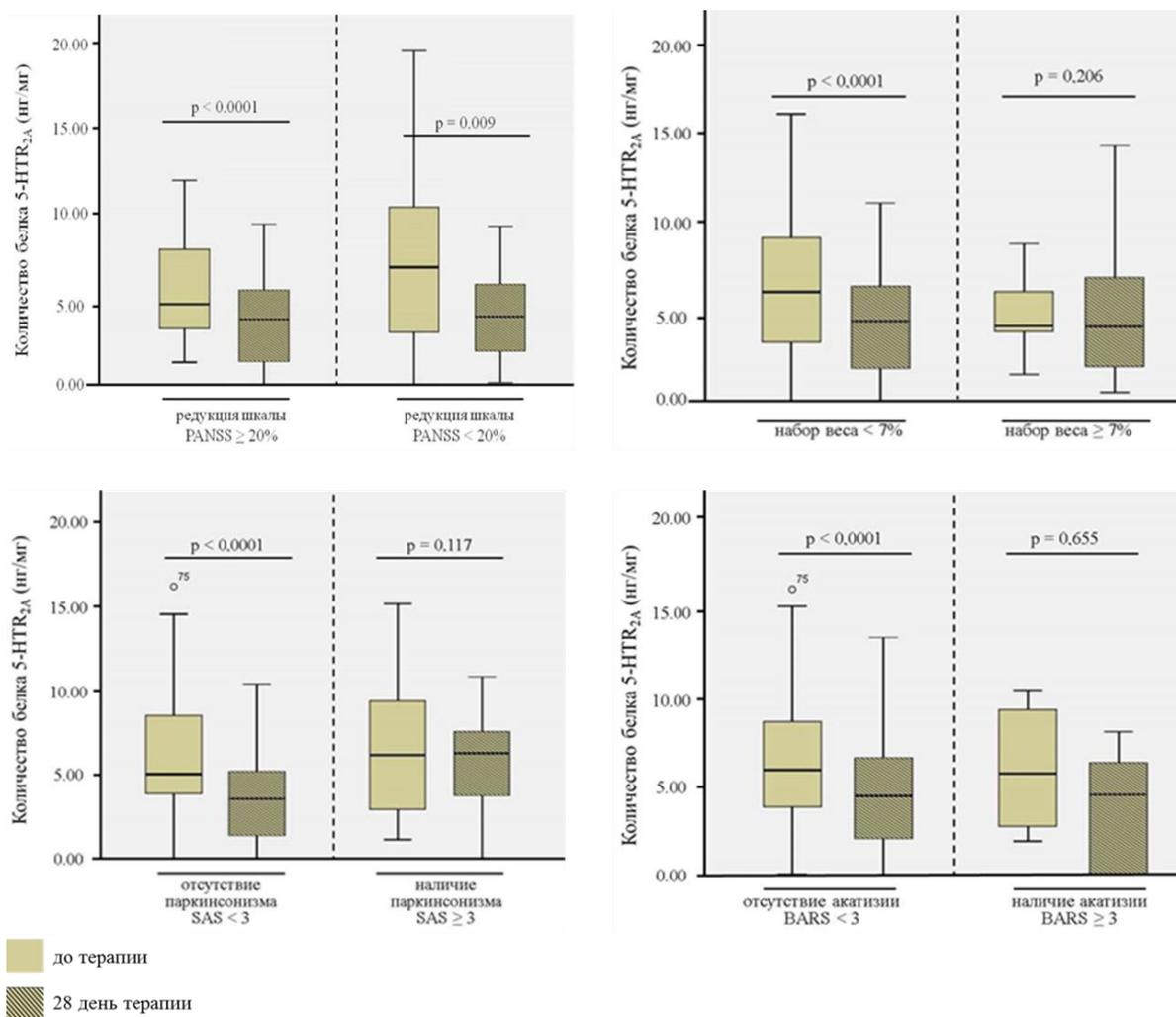


Рисунок 3.14 – Изменение концентрации белка рецептора 5-HT_{2A} в ЛПК в зависимости от ответа пациента на антипсихотическую терапию

Ассоциаций носительства различных генетических вариантов rs6311, rs6313 *HTR2A* с формированием негативных побочных эффектов на фоне терапии антипсихотиками выявлено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на почти двухвековую историю развития психиатрии, диагностического теста для постановки конкретного раннего диагноза психических расстройств и прогноза ответа пациента на антипсихотическую терапию на основе клинически наблюдаемых симптомов не найдено. При этом, показано, что пациенты с психическими расстройствами и здоровые доноры имеют существенные различия как в структуре головного мозга, так и транскрипционном профиле генов, экспрессирующихся в нем (Wang et al., 2017; Lewis & Lieberman, 2000; Wong & Van Tol, 2003). В течение последних двадцати лет актуальной темой для исследователей этиопатогенеза и фармакодинамики лекарственных средств терапии РПС был поиск надежного прогностического биомаркера развития патологии, а также персонализации лекарственной терапии (Mohammadi et al., 2018).

На данный момент оценка транскриптомной организации головного мозга в ходе терапии ограничена (только ПЭТ). Использование ЛПК в качестве объекта анализа при поисковых исследованиях периферических биомаркеров заболевания и эффективности/безопасности терапии имеет большой потенциал, поскольку психические расстройства рассматривают в настоящее время как системные патологии, где показатели крови отражают иммунный, эндокринный и общий патофизиологический статус пациента. Oldmeadow с соавторами показали различие в экспрессии изоформ транскриптов у лиц с психическими заболеваниями не только в тканях мозга, но и в иммунных клетках крови (Oldmeadow et al., 2014). Независимо, в исследовании на крысах, принимавших кетамин (продуцирует симптомы шизофрении) и подвергнутых стрессу, показано, что корреляция экспрессии генов ЛПК и клеток головного мозга без

стресса нарушается под действием препарата, но после стресса, корреляция экспрессии РНК вновь появляется (Bosker et al., 2012).

Роль рецептора 5-НТ_{2А} в нормализации психического состояния обсуждалась с 1980-х годов, когда было предложено, что антагонизм 5-НТ_{2А} определяет терапевтический эффект клозапина. В иммунных клетках рецептор 5-НТ_{2А} участвует в процессах хемотаксиса, пролиферации клеток и продукции цитокинов. Тем не менее, антагонизм серотонинергических рецепторов на ЛПК в эффективности антипсихотической терапии остается спорным.

В ходе работы показано, что относительный уровень экспрессии гена *HTR2A* и количество белка рецептора 5-НТ_{2А} в ЛПК у пациентов с РШС в актуальном психическом состоянии не отличалось от лиц контрольной группы, тогда как при коморбидном течении заболевания с синдромом алкогольной зависимости, изучаемые показатели были ниже. Понижение, как количества белка, так и экспрессии гена *HTR2A*, по всей видимости, связано не с заболеванием пациента, а с воздействием алкоголя на организм. Доказано влияние алкоголя на регуляцию экспрессии генов и процессы геномного метилирования. Марбалли с соавторами на экспериментальных животных (мыши) с алкогольной зависимостью показали, что происходит снижение экспрессии и повышение уровня метилирования большинства генов, представленных в дофаминергических нейронах, причем уровень экспрессии 930 транскриптов генов коррелировал с потреблением алкоголя (Marballi et al., 2016). Независимо, было продемонстрировано влияние алкоголя на профиль мРНК в мозге человека. Общее изменение экспрессии между лицами с алкогольной зависимостью и контрольной группой варьировало от 20% до 50% (Liu et al., 2006). Доказанным механизмом снижения уровня экспрессии генов при алкоголизме является эпигенетическая регуляция: за счет повышения уровня метилирования CG богатых

мотивов происходит модификация хроматина и модуляция экспрессии генов. В первую очередь, эти процессы затрагивают гены, экспрессирующиеся в префронтальной коре головного мозга, и гены модуляторы иммунной системы, в том числе кодирующие белки врожденного иммунитета. Также на регуляцию уровня мРНК генов при САЗ влияет изменение экспрессии длинных некодирующих РНК, приводящее к aberrantному сплайсингу мРНК. Описанные модификации генома показаны как при РНК секвенировании постмортальных образцов мозга человека, полученных от лиц страдавших САЗ (Dekker 2007; Farris et al., 2014; Farris et al., 2015a; Clark et al., 2015; Ponomarev et al., 2012; Ponomarev et al., 2010; Oldham et al., 2008; Zhang et al., 2004; Nunez & Mayfield, 2012; Wang F. et al., 2016), так и на модельных объектах под воздействием этанола – экспериментальных животных (Pandey et al., 2008; Lopez-Moreno et al., 2012) и *in vitro* на культурах клеточных линий (Agudelo et al., 2011).

В последние годы увеличилось число данных, указывающих на то, что фенотип, реализованный за счет индивидуальных различий в экспрессии генов и количестве белка, может быть рассмотрен как независимый биомаркер как развития психических расстройств (Yao et al., 2007; Suzuki et al., 2008; Numata et al., 2007; Numata et al., 2008; Kuzman et al., 2009), так и эффективности проводимого лечения (Li. Z. et al., 2018). Но, следует отметить, несмотря на определенные успехи научных исследований фенотипа, реализованного за счет дифференциальной экспрессии генов в ЛПК, ассоциированного с механизмами патогенеза психических заболеваний и терапевтическим ответом, реального продвижения научных результатов в клиническую практику не последовало. Внедрение данных результатов было осложнено гетерогенностью конкретных диагнозов пациентов, включенных в работу разными исследовательскими группами, и различными

антипсихотическими препаратами, применяемыми для терапии. Кроме того, некоторые из полученных данных не воспроизводились или не оставались статистически значимыми после объединения результатов по независимым исследованиям. Повышение относительного уровня мРНК *HTR2A* в ЛПК ранее было ассоциировано с развитием депрессии, вклад изучаемого показателя в патогенез РШС не был доказан. В работе, опубликованной в 2018 году, относительный уровень экспрессии *HTR2A* в образцах цельной крови drug naïve пациентов с РШС был связан с хорошим ответом на монотерапию рисперидоном, исследователи предлагали использование этого показателя в качестве биомаркера ответа на терапию (Li. Z. et al, 2018). По результатам нашей работы, ассоциаций между уровнем экспрессии гена и белка рецептора 5-HT_{2A} и эффективностью терапией как галоперидолом, так и оланзапином получено не было.

В ходе исследования мы показали, что антипсихотическая терапия в течение 28 дней, как в группе пациентов с РШС, так и в группе с коморбидным течением заболевания с САЗ, не оказывала влияния на уровень экспрессии *HTR2A* (не влияла на транскрипцию гена), при этом приводила к снижению количества белка рецептора 5-HT_{2A}. Данная ассоциация была сильнее при терапии оланзапином, обладающим более высоким сродством к рецептору 5-HT_{2A}. Этот факт можно объяснить включением процесса десенситизации рецепторов на поверхности клеток с интернализацией части рецепторов в эндсомы и последующей частичной деградацией. Поскольку оланзапин является частичным агонистом рецептора *HTR2A*, возможно, происходит активация клатрин-зависимого эндоцитоза рецептора с участием β -2 аррестинов (Попова с соавторами, 2013). Рецепторы, связанные с G белками, образуют гомодимеры HTR_{2A}-HTR_{2A} и гетеродимеры с рецепторами серотонина 2C и рецепторами дофамина D2 HTR_{2A}-HTR_{2C} и HTR_{2A}-DRD2 (Guiard and

Giovanni, 2015). Вероятно, действие галоперидола на рецепторы DRD2 в сочетании с изменением уровня общего метилирования при синдроме алкогольной зависимости, в совокупности, приводят к снижению количества белка 5-HT_{2A} в ЛПК. Ранее, методом лазерной конфокальной микроскопии было показано увеличение количества кластеров рецептора 5-HT_{2A} на ЛПК у больных депрессией, и снижения количества данных кластеров после 8 недель терапии антидепрессантами (Rivera-Baltanas et al., 2014).

Влияние антипсихотических препаратов на экспрессию на уровне транскрипции ряда генов показано как при исследованиях *in vivo* в ЛПК (количество мРНК, повышенное в стадии острого психоза, при нормализации психического статуса пациента снижалось до показателей лиц контрольной группы) (Numata et al., 2008; Kuzman et al., 2009); так и *in vitro* – на клеточных культурах Т лимфоцитов (Gardiner et al., 2014). Изменение регуляции экспрессии генов антипсихотическими препаратами происходит также за счет опосредованного влияния на экспрессию микро РНК и различных эпигенетических модификаторов. Причем, количество генов, подверженных воздействию препарата, зависит от конкретного антипсихотического лекарственного средства, применяемого для терапии. Изменение генной экспрессии на фоне фармакотерапии связывают с терапевтическим ответом пациента и возникновением побочных эффектов (Swathy & Banerjee, 2017).

Ввиду доказанной вовлеченности рецептора 5-HT_{2A} в патогенез многих психических расстройств, формировании алкогольной и наркотической зависимостей, генетические варианты *HTR2A* rs6311 и rs6313 являлись объектами пристального изучения последние 20 лет. Были исследованы ассоциации с различными психическими и неврологическими заболеваниями, ответом на терапию антидепрессантами, антипсихотиками. Следует отметить, что

опубликованные данные показывают противоречивые результаты, даже различающиеся в рамках одной и той же этнической популяции (Serretti et al., 2007). В ряде исследований была показана ассоциация носительства генетического варианта C(G) rs6311(rs6313), со сниженной транскрипционной способностью (снижение количества рецептора) с риском развития психических заболеваний (Sujitha et al., 2014), при этом, зачастую на грани статистической значимости (Sun et al., 2016). В ходе данного исследования не было обнаружено ассоциации носительства генетических вариантов rs6313(C/T) и rs 6311(G/A) с риском развития РШС. Вероятно, данные генетические варианты вносят лишь частичный вклад в риск развития психических расстройств. Ранее было показано, что существует комбинация генетических вариантов *HTR2A*, ассоциированная с повышенным риском развития параноидной шизофрении, а именно: *HTR2A* rs6311 G/-, rs6313 C/-, rs6314 C/C, rs7997012 G/- что подтверждает роль данного рецептора и изучаемых вариантов гена в патогенезе шизофрении (Галактионова с соавт, 2012).

Также было показано, что генотипы GG(CC) rs6311(rs6313) ассоциированы с суицидальным поведением у пациентов с параноидной шизофренией (Галактионова с соавт, 2012). Вероятно, данные генетические варианты определяют клинические проявления психических заболеваний (преобладание определенных симптомов).

HTR2A относится к наиболее изучаемым генам в области фармакогеномики белков, задействованных в фармакодинамике антипсихотических лекарственных средств (Pouget, Muller, 2014). *In vitro* показано, что генетические варианты *HTR2A* гена, приводящие к миссенс-мутациям, нарушают аффинность ряда атипичных антипсихотиков и селективных агонистов к рецептору 5-HT_{2A} и формируют индивидуальный ответ на фармакотерапию (Davies et al., 2006). Вклад *HTR2A* в фармакодинамику лекарственного средства популяционно

зависим и варьирует от нейрхимического действия препарата (Serretti et al., 2007; Anttila et al., 2007). В данной работе показана ассоциация носительства генетического варианта GG (CC) с эффективной терапией галоперидолом, что согласуется с результатами, полученными для пациентов европейского происхождения (Гареева с соавт., 2015; Benmessaoud et al., 2008). Тогда как для лиц азиатского происхождения получены противоположные результаты - вариант GG был ассоциирован с худшим ответом на терапию оланзапином, клозапином и арипипразолом (Zhang et al., 2011) в особенности при лечении негативных симптомов.

В представляемой работе впервые было оценено влияние генетических вариантов rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* на показатели экспрессии рецептора 5-HT_{2A} на уровне мРНК и белка в группах контроля и пациентов с психическими расстройствами. Изучаемые генетические варианты не были ассоциированы с показателями относительного уровня мРНК гена *HTR2A*. При этом, в актуальном психическом состоянии в группах пациентов показана ассоциация вариантов AA (TT) и AG (TC) со статистически значимым увеличением количества белка рецептора 5-HT_{2A}. Несмотря на противоречивые результаты исследований влияния изучаемых ОПВ на функциональную активность гена, большинство авторов склоняются к мысли, что аллели А rs6311 и Т rs6313 сопряжены с более высокой промоторной активностью по сравнению с аллелями G и C, соответственно (Smith, Dimulescu et al, 2008; Falkenberg et al, 2011). При изучении механизмов действия изучаемых генетических вариантов на работу гена *HTR2A* было показано, что замена rs6311 влияет на выбор альтернативного сайта начала транскрипции, ассоциированного с более длинным 5'UTR регионом и увеличением эффективности трансляции белка (Smith et al., 2013), а rs6313 воздействует на вторичную структуру транскрипта, меняя его стабильность и трансляционную активность

(Serretti et al., 2007). Так как описанные механизмы представляют собой посттранскрипционные процессы, фенотипическая реализация генетических вариантов rs6311 (rs6313) *HTR2A* должна, прежде всего, затрагивать уровень белка, практически не влияя на количество мРНК гена, что согласуется с представляемыми результатами.

На фоне фармакотерапии уровень мРНК *HTR2A* и количество белка рецептора 5-НТ_{2А} менялось в зависимости от носительства аллельного варианта rs6311 (rs6313), а также применяемого препарата. По данным настоящего исследования, на фоне терапии галоперидолом, препаратом с низким аффинитетом к изучаемому рецептору, происходило увеличение экспрессии гена *HTR2A*, ассоциированное с носительством гомозиготного варианта GG, не сопровождающееся изменением количества белка на ЛПК.

Влияние галоперидола, антагониста дофаминовых рецепторов, на экспрессию гена рецептора серотонина, можно объяснить опосредованным механизмом воздействия. Ранее показано, что галоперидол увеличивает уровень нейромедиатора серотонина в префронтальной коре головного мозга, а галоперидол-индуцированная гиперактивность дофаминовых рецепторов опосредуется 5-НТ_{2А} рецепторами (Benaliouad et al., 2006; Charron et al., 2015).

Несмотря на то, что тела клеток дофаминергических, норадренергических и серотонинергических нейронов в ЦНС локализованы в дискретных ядрах, их проекции на передний мозг создают комплексные сети перекрывающихся иннерваций, образуя общую моноаминергическую систему, модулирующую высшие психические процессы. Существует взаимная иннервация между различными типами моноаминергических нейронов, обеспечивающая их тесные функциональные взаимодействия (Hensler et al., 2013): доказана ключевая роль 5-НТ_{2А} в стабилизации и/или модуляции

дофаминергической нейротрансмиссии в мезокортикальных и мезолимбических путях (Masana et al., 2012).

Можно предположить, что в периферическом русле крови происходят подобные взаимодействия между моноаминами через эффекторные рецепторы, расположенные на моноклелерных клетках, формируется единая взаиморегулируемая сеть моноаминного гомеостаза. При воздействии галоперидола, ингибировании рецепторов дофамина, подобно процессам стабилизации взаимодействия моноаминов головного мозга, через 5-HT_{2A} на лимфоцитах запускается позитивная регуляция дофаминергической трансмиссии, промотируется экспрессия *HTR2A*, причем генотип зависимым образом. Так как генетический вариант GG ассоциирован с пониженным процессингом белка, то повышение экспрессии гена не влияет на уровень белка на ЛПК. И, по всей видимости, ассоциация ОПВ rs6311 (rs6313) гена *HTR2A* с эффективностью терапии галоперидолом связана с генотип-зависимым повышением экспрессии гена *HTR2A* на фоне действия данного препарата.

Анализ нескольких уровней транскриптомной организации: экспрессии гена, локального сплайсинга, экспрессии изоформ транскрипта показал, что изменения на уровне изоформ, в отличие от уровня генов, имеют больший количественный эффект и наибольшую специфичность при психических заболеваниях. Показано, что при психических патологиях, в том числе и шизофрении, более 25% транскриптома дифференциально сплайсируется в головном мозге по сравнению с контрольной группой (Gandal et al., 2018).

В данной работе впервые показана дифференциальная экспрессия изоформ транскриптов экзона II гена *HTR2A* в ЛПК у лиц контрольной группы и пациентов с РШС. Следует отметить, что большинство исследований, посвященных изучению роли альтернативного сплайсинга

экзонов в патогенезе психических патологий, было проведено на тканях головного мозга постмортально (Reble et al., 2017). Оценка транскриптомной организации в образцах мозга ограничена, поэтому актуален поиск периферических биомаркеров заболевания и прогноза терапии. Результаты этой работы показали, что дисрегуляция экспрессии изоформ транскриптов в ЛПК у пациентов с РСШ могут являться частью периферического звена патогенеза заболевания.

Альтернативные изоформы генов нейротрансмиссии играют важную роль в нормальном развитии мозга в ходе онтогенеза, и их дисбаланс наблюдается при психических расстройствах. В 2017 году Ну с соавторами предложили теорию принципов частотного распределения изоформ транскрипта: (1) гены склонны экспрессировать все свои изоформы одновременно, но в разной степени; (2) основная и второстепенная доминантная изоформа гена составляет более 30% и 15% от общей экспрессии транскрипта, соответственно (Ну et al., 2017). Результаты представляемого исследования демонстрируют увеличенное количество как альтернативных изоформ экзона II E2tr, E2-, так и конститутивной изоформы E2+ у пациентов с РСШ в стадии острого психоза по сравнению с контрольной группой. В связи с этим можно сделать предположение, что процессы, вовлеченные в патогенез РСШ, приводят не только к дисбалансу экспрессии генов моноаминергической нейротрансмиссии, но также и к изменению паттерна транскриптов в рамках одного гена. Было обнаружено изменение в уровне экспрессии альтернативных изоформ в постмортальных образцах мозга, однако это явление в ЛПК показано нами впервые. В контрольной группе количество мРНК изоформ экзона II не различалось между собой, в то время как у пациентов с РСШ экспрессия изоформ E2+, E2tr и E2- имела различия как в стадии острого психоза, так и после 28 дней антипсихотической терапии. Причем терапия оланзапином была связана со снижением

относительного уровня экспрессии альтернативной изоформы E2- у пациентов, гомозиготных по аллелю А (rs6311). Транскрипт с пропущенным вторым экзоном (E2-) кодирует белок с отличиями в первом трансмембранном домене и N-терминальном конце. Учитывая тенденцию рецепторов, связанных с G-белком образовывать гетеродимеры, соотношение между транскриптами E2+ и E2- может оказывать влияние на функциональные особенности белковых комплексов.

В заключение хочется отметить, что большинство исследований, изучающих иммунопатогенез психических заболеваний, были проведены на пациентах с хронической шизофренией, в ряде случаев, купированной антипсихотическими препаратами. В связи с этим, они имели ряд существенных ограничений: влияние антипсихотической терапии и метаболических расстройств (включая избыточную массу тела), ассоциированных с фармакотерапией, на изучаемые показатели. Следовательно, исследования на пациентах с первым психотическим эпизодом (не получавших терапию нейролептиками ранее) с индексом массы тела в пределах нормы, предпочтительнее для раскрытия основ иммунопатогенеза психических расстройств, расширение групп изучаемых пациентов и спектра иммунологических параметров позволит дополнить современное представление нейро-иммунных взаимоотношениях ЛПК при фармакокоррекции острых психотических состояний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование посвящено изучению роли рецептора серотонина 2а лимфоцитов периферической крови (в качестве возможного биомаркера) в патогенезе расстройств шизофренического спектра и прогнозе терапии антипсихотиками галоперидолом и оланзапином. Были оценены параметры: количество белка, уровень мРНК *HTR2A*, уровень изоформ с участием II экзона *HTR2A* (E2+, E2tr, E2-) в ЛПК в группах пациентов с РШС как до, так и после 28 дней терапии антипсихотиками I и II поколения (оланзапин, галоперидол) а также в группе психически здоровых лиц. Была проведена оценка частоты носительства генетических вариантов rs6311(A/G), rs6313(T/C) *HTR2A*. Были оценены ассоциации указанных выше параметров с развитием РШС, эффективностью антипсихотической терапии, развитием нежелательных явлений терапии (акатизия, паркинсонизм, антипсихотик-индуцированный набор массы тела).

Впервые было показано:

- снижение уровня экспрессии гена *HTR2A* на уровнях мРНК и белка в ЛПК у пациентов с коморбидным течением РШС с САЗ.
- изменение паттерна транскриптов II экзона в группе психически больных с преобладанием экспрессии альтернативных изоформ E2tr, E2-.
- безопасная терапия оланзапином или галоперидолом ассоциирована со снижением концентрации белка 5-HT_{2A} в ЛПК через 28 дней лечения.

Найдены потенциальные биомаркеры:

- эффективности терапии оланзапином и галоперидолом (повышенный относительный уровень экспрессии изоформы E2- в ЛПК).
- эффективности терапии галоперидолом (носительство генетического варианта GG (CC) rs6311(rs6313)) *HTR2A*.

- развития акатизии у пациентов с РШС без САЗ при терапии оланзапином и галоперидолом (более низкие показатели относительного уровня мРНК изоформ E2+, E2-, E2tr в ЛПК).
- развития паркинсонизма при терапии оланзапином и галоперидолом (более высокие показатели уровней мРНК и белка 5-HT_{2A} в ЛПК у пациентов с РШС и САЗ).

Данное исследование является пилотным. Далее необходимо провести скринирование установленных биомаркеров эффективности и безопасности терапии нейролептиками на больших выборках, для дальнейшего включения их в алгоритм персонализированных подходов и определение клинической эффективности и прогностической значимости изучаемых параметров.

ВЫВОДЫ

1. Коморбидное течение расстройств шизофренического спектра (РШС) с синдромом алкогольной зависимости (САЗ) ассоциировано со снижением экспрессии гена *HTR2A* (мРНК, белок) в лимфоцитах периферической крови.
2. Расстройства шизофренического спектра характеризуются увеличением количества мРНК вариантов сплайсинга II экзона (E2+, E2-, E2tr) *HTR2A* и изменением пропорционального соотношения уровня их экспрессии за счет преобладания альтернативных изоформ (E2-, E2tr) в лимфоцитах периферической крови (ЛПК).
3. Редукция количества белка рецептора 5HT_{2A}, индуцированная антипсихотической терапией, зависит от аффинности лекарственного средства: оланзапин, препарат имеющий большую аффинность к 5HT_{2A}, приводит к снижению уровня его белка в ЛПК; генетического варианта rs6311 (rs6313) *HTR2A*: снижение уровня белка 5HT_{2A} ассоциировано с носительством аллеля A(T) rs6311(rs6313) *HTR2A*.
4. Терапия оланзапином и галоперидолом в течение 4-х недель и ответ на нее не ассоциированы с изменением концентрации сывороточных цитокинов IL-6, IL-1 β , TGF- β 1 у пациентов с РШС.
5. Эффективность антипсихотической терапии галоперидолом ассоциирована с генетическими вариантами GG rs6311 и CC rs6313 *HTR2A*. Эффективность перапии галоперидолом и оланзапином ассоциирована с повышенным уровнем экспрессии изоформы E2- в ЛПК. Экстрапирамидные побочные эффекты при приеме галоперидола и оланзапина ассоциированы: акатизия – с пониженным уровнем изоформ E2+, E2-, E2tr *HTR2A* до терапии у пациентов с РШС, паркинсонизм – с более высокими уровнями белка и мРНК *HTR2A* до терапии у пациентов с РШС с САЗ. Отсутствие снижения количества белка рецептора 5HT_{2A} при воздействии антипсихотических

лекарственных средств является фактором риска развития
нежелательных явлений.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- РШС расстройства шизофренического спектра
- САЗ синдром алкогольной зависимости
- ОПВ однонуклеотидный полиморфный вариант
- ЛПК лимфоциты периферической крови
- BARS Barnes Akathisia Rating Scale
- SAS Simpson Angus Scale
- PANSS Positive and Negative Syndrome Scale (шкала позитивных и негативных синдромов)
- ПЭТ позитронная эмиссионная томография
- ЦНС центральная нервная система
- ГАМК гаммааминомасляная кислота
- VTA вентральная область покрышки
- PFC префронтальная кора
- GAPDH Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- GNB2L1 Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1
- ПДРФ полиморфизм длины рестриционных фрагментов
- DRD2 рецептор дофамина D2
- 5-HT_{2A} рецептор серотонина 2A
- HTR2A* ген рецептора серотонина 2A
- DAMPs молекулярный фрагмент, ассоциированный с повреждениями
- NMDA N-метил-D-аспартат рецептор (ионотропный рецептор глутамата)
- MAO моноаминоксидаза
- SERT переносчик серотонина
- TRH1 триптофангидроксилаза 1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белинская, М.А. Рецептор серотонина 5-НТ2А лимфоцитов периферической крови у пациентов с расстройствами шизофренического спектра: влияние терапии оланзапином / М.А. Белинская, А.М. Заботина, А.Е. Тараскина // Сборник «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». – 2017. – С. 679-684.
2. Бохан, Н. А., Серотониновая система в модуляции депрессивного и агрессивного поведения / Н. А. Бохан, С. А. Иванова, Л. А. Левчук – Томск: Издательство Иван Фёдоров. – 2013. – 102с.
3. Галактионова, Д.Ю. Анализ ассоциации полиморфизма генов HTR2A, BDNF и SLC6A4 с развитием параноидной формы шизофрении и суицидального поведения / Д.Ю. Галактионова, О.А. Гра, И.И. Низамутдинов, А.Э. Гареева, Д.Ф. Закиров, Э.К. Хуснутдинова, Ю.П. Лысов, Т.В. Наседкина // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. - 2012. – Т.112 т – No10. – С.39-44.
4. Гареева, А.Э. Полиморфизм генов нейромедиаторных систем мозга: поиск фармакогенетических маркеров эффективности галоперидола у русских и татар /А.Э. Гареева, К. О. Киняшева, Д. Ю. Галактионова, Э.Т. Сабиров, Р. Г. Валинуров, А. В. Чудинов, А. С. Заседателев, Т. В. Наседкина, Э. К. Хуснутдинова // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 48. - No6. - С.771-781.
5. Голубев, В.Л. Неврологические синдромы. Руководство для врачей / Голубев В.Л., Вейн А.М. — Москва: Эйдос Медиа. – 2002. – 832 с.
6. Грунина, М.Н., Вклад изоформ транскриптов экзона II гена HTR2a в риск развития психических патологий и прогноз антипсихотической терапии / М.Н. Грунина, А.М. Заботина, А.С. Журавлев, Р.Ф. Насырова, А.Е. Тараскина // Медицинская генетика. – 2020. – 19(4). – С. 24-26.

7. Дмитриева, Т.Б. Психиатрия: национальное руководство / под ред. Т.Б. Дмитриевой, В.Н. Краснова, Н.Г. Незнанова, В.Я. Семке, А.С. Тиганова. — М.: ГЭОТАР – Медиа. — 2009. — 1000 с.
8. Заботина, А.М. Влияние полиморфных вариантов rs6311 и rs6313 гена рецептора серотонина 2A (HTR2A) на уровень его мРНК и белка в лейкоцитах периферической крови при терапии антипсихотиками / А.М. Заботина, М.Н. Белинская, А.С. Журавлев, Р.Ф. Насырова, Д.Н. Сосин, Е.Е. Ершов, А.Е. Тараскина, Е.М. Крупицкий // Цитология. — 2018. — Т.60. — №5. — С.381-389.
9. Заботина, А.М. Снижение количества рецептора серотонина 2A в лимфоцитах периферической крови при антипсихотической терапии – маркер безопасности проводимого лечения / А.М. Заботина, М.Н. Грунина, Е.В. Волкова, Р.Ф. Насырова, А.Е. Тараскина // Медицинская генетика. — 2020. — 19(4). — С. 58-59.
10. Иванов, М.В. Фармакогенетические аспекты нейролептической терапии психических расстройств / Иванов М.В., Чомский А.Н // Обоз. Псих. И мед. Псих. — 2012. — №4. — С. 40-43.
11. Лычкова А. Э., Пузилов А. М. Серотонинергическая регуляция иммунной системы // Успехи физиол. наук. — 2014. Т. 45. № 4. — С. 69–88.
12. Дробижев, М.Ю. Антипсихотики: меняем старые поколения на новую классификацию? / М.Ю. Дробижев, А.А. Овчинников // Социальная и клиническая психиатрия" — 2010. Т. 20. — № 2.
13. Маниатис Т. и др. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. — М.: Мир, 1984. — 480с.
14. Мосолов, С. Н. Биологические методы терапии психических расстройств (доказательная медицина - клинической практике) / С. Н. Мосолов – Социально-политическая мысль. — 2012. — 1080 с.

15. Насырова, Р.Ф. Введение в психофармакогенетику / Насырова Р.Ф., Иванов М.В., Незнанов Н.Г. – СПб: Издательский центр СПб НИПНИ им. В. М. Бехтерева. – 2015. — 272 с
16. Насырова, Р.Ф. Клиническая психофармакогенетика / под ред. Насыровой Р.Ф., Незнанова Н.Г. – СПб: Издательство ДЕАН – 2019. – 405 с.
17. Насырова, Р.Ф. Инструменты персонифицированной оценки эффективности антипсихотической терапии: рецепторы нейротрансмиссии на лимфоцитах периферической крови / Р.Ф. Насырова, А.Е. Тараскина, Д.Н. Сосин, К.А. Сосина, Е.Е. Ершов, А.М. Заботина, М.Н. Грунина, Е.М. Крупицкий // Сибирское медицинское обозрение. – 2016. – №2(98). – С. 57-64.
18. Попова Н. В., Деев И. Е., Петренко А. Г. Клатрин-зависимый эндоцитоз и белки-адаптеры // Acta naturae. – 2013. – Т. 5 № 3 (18). – С. 66-77.
19. Руководство по эксплуатации систем ПЦР реального времени с флуоресцентной детекцией CFX96 Touch, CFX96 TouchDeepWell, CFXConnect и CFX384 Touch.
20. Тараскина, А.Е. Влияние антипсихотических препаратов на рецепторы моноаминов мононуклеарных клеток периферической крови: аффинитет-сцепленный механизм. / А.Е. Тараскина, А.М. Заботина, Р.Ф. Насырова, Д.Н. Сосин, К.А. Сосина, Е.Е. Ершов, М.Н. Грунина, Е.М. Крупицкий // Биомедицинская химия. – 2018. – Т. 64 (2). – С. 201-207.
21. Фармакологический справочник «Видаль» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.vidal.ru/drugs/molecule/766>, свободный.
22. Федорова, Н.В. Диагностика и лечение нейролептических экстрапирамидных синдромов: Учебно-методическое пособие / Н.В. Федорова, Т.Н. Ветохина— М.: РМАПО. – 2006. – 540 с..

23. Шилов, Ю.Е. Кинуренины в патогенезе эндогенных психических заболеваний / Ю. Е. Шилов, М. В. Безруков //Актуальные вопросы неврологии и психиатрии. Вестник РАМН. – 2013. – №1.
24. Agudelo, M. Effects of alcohol on histone deacetylase 2 (HDAC2) and the neuroprotective role of trichostatin A (TSA) / Agudelo M., Gandhi N., Saiyed Z., Pichili V., Thangavel S., Khatavkar P., Yndart-Arias A., Nair M. // Alcohol Clin Exp Res. – 2011. – V. 35. – P. 1550-1556.
25. Ahern, G.P. 5-HT and the immune system / Ahern G.P. // Curr Opin Pharmacol. – 2011. – V. 11(1). – P. 29-33.
26. Anttila, S. Association between 5-HT_{2A}, TPH1 and GNB3 genotypes and response to typical neuroleptics: a serotonergic approach / Anttila S., Kampman O., Illi A., Rontu R., Lehtimäki T., Leinonen E. // BMC Psychiatry. – 2007. –V. 23. – P. 7:22.
27. Arreola, R. Immunomodulatory Effects Mediated by Serotonin / Arreola R., Becerril-Villanueva E., Cruz-Fuentes C., Velasco-Velázquez M. A., Garcés-Alvarez M. A., Hurtado-Alvarado G., Quintero-Fabian S., and Pavón L. // Journal of Immunology Research. – 2015. – V. 2015.
28. Ashok, A. H. “Paul Eugen Bleuler and the origin of the term schizophrenia (Schizopreniegruppe)” / Ashok A. H., Baugh J., Yeragani V. K. (2012). // Indian J Psychiatry. V.54 (1). P.95-96.
29. Aznar, S. The 5-HT_{2A} serotonin receptor in executive function: implications for neuropsychiatric and neurodegenerative diseases / Aznar S., Hervig M. E. // Neurosci Biobehav Rev. – 2016. – V. 64. – P. 63-82.
30. Balt, S. L. Mechanisms and genetics of antipsychotic-associated weight gain / Balt S. L., Galloway G. P., Baggott M. J., Schwartz Z., Mendelson J. // Clin. Pharmacol. Ther. – 2011. – V. 90. – P. 79-83.
31. Barrie, E.S. mRNA Transcript Diversity Creates New Opportunities for Pharmacological Intervention / Barrie E.S., Smith R.M., Sanford J.C., Sadee W. // Mol. Pharmacol. – 2012. – V. 81. – P. 620–630.

32. Benaliouad, F. Blockade of 5-HT_{2a} receptors reduces haloperidol-induced attenuation of reward. / Benaliouad F., Kapur S., Rompré P. P. // *Neuropsychopharmacology*. – 2007. – V. 32(3). – P. 551-561.
33. Benmessaoud, D. Excess of transmission of the G allele of the -1438A/G polymorphism of the 5-HT_{2A} receptor gene in patients with schizophrenia responsive to antipsychotics / Benmessaoud D., Hamdani N., Boni C., Ramoz N., Hamon M., Kacha F., Gorwood P. // *BMC Psychiatry*. – 2008. – V.30. – P. 8-40.
34. Bergguist, J. Identification of catecholamines in the immune system by electrospray ionization mass spectrometry / Bergguist J., Silberring J. // *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* – 1998. – V.12 (11). – P. 683-688.
35. Bhana, N. Olanzapine: an updated review of its use in the management of schizophrenia / Bhana N., Foster R. H., Olney R., Plosker G. L. // *Drugs*. 2001. – V. 61. – P. 111-61.
36. Bishop, J. R. Handbook of clinical Neurology. Pharmacogenetics. Chapter 6. / Bishop J. R. // Jeffrey R. Bishop. Editors: Daniel H. Geschwind, Henry L. Paulson, Christine Klein. – Elsevier, 2018. – V. 147. – P. 59-73.
37. Bosker, F. J. Comparison of brain and blood gene expression in an animal model of negative symptoms in schizophrenia / Bosker F. J., Gladkevich A.V., Pietersen C. Y., Kooi K. A., Bakker P. L., Gerbens F., den Boer J. A., Korf J., te Meerman G. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. – 2012. – V. 38(2). – P. 142-148.
38. Brancheck, T. [3H]-DOB (4-bromo-2, 5-dimethoxyphenylisopropylamine) and [3H] ketanserin label two affinity states of the cloned human 5-hydroxytryptamine₂ receptor / Brancheck T., Adham N., Macchi M., Kao H.T., Hartig P.R. // *Mol Pharmacol*. – 1990. – V. 38. – P. 604-609.
39. Brody, H. Schizophrenia / Brody H. // *Nature*. – 2014. – V. 508(7494). – P.S1.

40. Butler, M.G. Pharmacogenetics and Psychiatric Care: A review and commentary / Butler M.G. // *J Ment Health Clin Psychol.* – 2018. – V. 2(2). – P. 17-24.
41. Cai, Z. Oligodendrocytes and Alzheimer's disease / Cai Z., Xiao M. // *Int J Neurosci.* – 2016. – V. 126(2). – P. 97-104.
42. Champion, D. P. Translating pharmacogenomics to the clinic: progress in human and veterinary medicine / Champion D. P., Dowell F. J. // *Frontiers in veterinary science.* 2019. – Vol. 6(22). – P. 1-11.
43. Capuzzi, E. Acute variations of cytokine levels after antipsychotic treatment in drug-naive subjects with a first-episode psychosis: a meta-analysis / Capuzzi E., Bartoli F., Crocamo C., Clerici M., Carra G. // *Neurosci Biobehav Rev.* – 2017. – V. 77. – P.122-128.
44. Carhart-Harris, R. L. The paradoxical psychological effects of lysergic acid diethylamide (LSD) / Carhart-Harris R. L., Kaelen M., Bolstridge M., Williams T. M., Williams L. T., Underwood R., Feilding A., Nutt D. J. // *Psychol Med.* – 2016. – V. 46. – P. 1379-1390.
45. Caudle, K. E. Evidence and resources to implement Pharmacogenetic Knowledge for Precision Medicine / Caudle K. E., Gammal R. S., Whirl-Carrillo M., Hoffman J. M., Relling M. V., Klein T. E. // *Am J Health Syst Pharm.* – 2016. – V. 73(23). – P. 1977-1985.
46. Charlson, F. J. Global Epidemiology and Burden of Schizophrenia: Findings From the Global Burden of Disease Study 2016 / Charlson F. J., Ferrari A. J., Santomauro D. F., Diminic S., Stockings E., Scott J. G., McGrath J. J., & Whiteford H. A. // *Schizophrenia bulletin.* – 2018. – V. 44(6). – P. 1195-1203.
47. Charron, A. 5-HT₂ receptors modulate the expression of antipsychotic-induced dopamine supersensitivity / Charron A., Hage C. E., Servonnet A., Samaha A. N. // *Eur Neuropsychopharmacol.* – 2015. – V.25 (12). – P. 2381-2393.

48. Cheah, S. Y. mRNA expression and DNA methylation analysis of serotonin receptor 2A (HTR2A) in the human schizophrenic brain / Cheah S. Y., Lawford B. R., Young R. M., Morris C. P., Volsey J. // *Genes*. – 2017. – V. 8 (1). – P. 14.
49. Chen, K. The human 5-HT₂ receptor is encoded by a multiple intron-exon gene / Chen K., Yang W., Grimsby J., Shih J.C. // *Brain Res Mol Brain Res*. – 1992. – V. 14(1-2). – P. 20-26.
50. Clark, S. L. Combined Whole Methylation and Genomewide Association Study Implicates CNTN4 in Alcohol Use / Clark S. L., Aberg K. A., Nerella S., Kumar G., McClay J. L., Chen W., Xie L. Y., Harada A., Shabalin A. A., Gao G., Bergen S. E., Hultman C. M., Magnusson P. K., Sullivan P. F., van den Oord E. J. // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2015. – V. 39. – P. 1396–1405.
51. Climente-González, H. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer / Climente-González H., Porta-Pardo E., Godzik A, Eyraes E. // *Cell Rep*. – 2017. – V. 20(9). – P. 2215-2226.
52. Consentino, M. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop / Consentino M., Fietta A.M., Ferrari M., Rasini E., Bombelli R., Carcano E., Saporiti F., Meloni F., Marino F., Lecchini S. // *Blood*. – 2007. – V. 109(2). – P. 632-642.
53. Cui, Y. The mRNA expression status of dopamine receptor D2, dopamine receptor D3 and DARPP-32 in T lymphocytes of patients with early psychosis / Cui Y., Prabhu V., Nguyen T. B., Yadav B. K., Chung Y. C. // *Int. J. Mol. Sci*. – 2015. – V. 16, № 11. – P. 26677-26686.
54. Da Silva Alves, F. The revised dopamine hypothesis of schizophrenia: evidence from pharmacological MRI studies with atypical antipsychotic medication / Da Silva Alves F., Figuee M., van Amelsvoort T., Veltman D., de Haan L. // *Psychopharmacol Bull*. – 2008. – V. 1. № 41. – P. 121–132.

55. Davis, J. M. The choice of drugs for schizophrenia / Davis J. M. // *N Engl J Med.* – 2006. – V. 354(5). – P. 518-520.
56. De Deurwaerdere, P. Serotonergic modulation of the activity of mesencephalic dopaminergic system: therapeutic implications / De Deurwaerdere P., Di Giovanni G. // *Prog Neurobiol.* – 2017. – V. 151. – P. 175-236.
57. Dean, B. Increased levels of serotonin_{2A} receptors and serotonin transporter in the CNS of neuregulin 1 hypomorphic/mutant mice / Dean B., Karl T., Pavey G., Boer S., Duffy L., Scarr E. // *Schizophr Res.* – 2008. – V. 99. – P. 341-349.
58. Dekker, J. GC- and AT-rich chromatin domains differ in conformation and histone modification status and are differentially modulated by Rpd3p / Dekker J. // *Genome Biol.* – 2007. – V. 8. – P. R116.
59. Di Giovanni, G. Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence / Di Giovanni G., Di Matteo V., Pierucci M., Esposito E. // *Prog Brain Res.* – 2008. – V. 172. – P. 45-71.
60. Ding, M. Activation of Th17 cells in drug naïve, first episode schizophrenia / Ding M., Song X., Zhao J., Gao J., Li X., Yang G., Wang X., Harrington A., Fan X., Lv L. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* – 2014. – V. 51. – P. 78-82.
61. Doorduyn, J. Neuroinflammation in schizophrenia-related psychosis: a PET study / Doorduyn J., de Vries E.F., Willemsen A.T., de Groot J.C., Dierckx R.A., Klein H.C. // *J Nucl Med.* – 2009. – V. 50(11). – P. 1801-1807.
62. Drummond, J. B. Transmembrane AMPA receptor regulatory protein (TARP) dysregulation in anterior cingulate cortex in schizophrenia / Drummond J. B., Tucholski J., Haroutunian V., Meador-Woodruff J. H. // *Schizophr. Res.* – 2013. – V. 147(1). – P. 32-38.

63. Ebdrup, B.H. Serotonin 2A receptor antagonists for treatment of schizophrenia / Ebdrup B.H., Rasmussen H., Arnt J., Glenthøj B. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2011. – V. 20. – P. 1211-1223.
64. Ezeoke, A. A systematic, quantitative review of blood autoantibodies in schizophrenia / Ezeoke A., Mellor A., Buckley P., Miller B. // *Schizophrenia Res.* – 2013. – V.150. – P. 245– 251.
65. Falkenberg, V. R. Functional genomics of serotonin receptor 2A (HTR2A): interaction of polymorphism, methylation, expression and disease association / Falkenberg V. R , Gurbaxani B. M., Unger E. R., Rajeevan M. S. // *Neuromolecular Med.* – 2011. – V.13(1). – P. 66-76.
66. Farris, S. P. Transcriptome organization for chronic alcohol abuse in human brain / Farris S. P., Arasappan D., Hunicke-Smith S., Harris R. A., Mayfield R. D. // *Mol Psychiatry.* – 2015a. – V. 20. – P. 1438-1447.
67. Farris, S. P. RNA-Seq reveals novel transcriptional reorganization in human alcoholic brain / Farris S. P., Mayfield R. D. // *Int Rev Neurobiol.* – 2014. – V. 116. – P. 275-300.
68. Ferreira, T.B. Dopamine up-regulates Th17 phenotype from individuals with generalized anxiety disorder / Ferreira T.B., Kasahara T.M., Barros P.O., Vieira M.M.M., Bittencourt V.C.B., Hygino J., Andrade R.M., Linhares U.C., Andrade A.F., Bento C.A. // *J of Neuroimmunology.* – 2011. – V. 238. – P. 58-66.
69. Fomsgaard, L. Differences in 5-HT_{2A} and mGlu₂ receptor expression levels and repressive epigenetic modifications at the 5-HT_{2A} promoter region in the Roman Low- (RLA-I) and High- (RHA-I) Avoidance rat strains / Fomsgaard L., Moreno J. L., de la Fuente Revenga M., Brudek T., Adamsen D., Rio-Alamos C., Sauders J., Klein A.B., Oliveras I., Canete T., Blazquez G., Tobena A., Fernandez-Teruel A., Gonzales-Maeso J., Aznar S. // *Mol Neurobiol.* – 2018. – V. 55. – P. 1998-2012.

70. Frederick, A. L. Evidence against dopamine D1/D2 receptor heteromers / Frederick A. L., Yano H., Trifilieff P., Vishwasrao H. D., Biezonski D., Meszaros J., Sibley D. R., Kellendonk C., Sonntag K.C., Graham D. L., Colbran R. J., Stanwood G. D., Javitch J. A. // *Mol Psychiatry*. – 2015. – V. 20(11). – P. 1373-1385.
71. Gaebel, W. Schizophrenia Current Science and Clinical Practice Edited by Wolfgang Gaebel/ Gaebel, W. // WPA Wiley Blackwell. – 2011. – P. 1-272.
72. Gandal, M.J. Transcriptome-wide isoform-level dysregulation in ASD, schizophrenia, and bipolar disorder / Gandal M.J., Zhang P., Hadjimichael E., Walker R.L., Chen C., Liu S., Won H., van Bakel H., Varghese M., Wang Y., Shieh A.W., Haney J., Parhami S., Belmont J., Kim M., Losada P.M., Khan Z., Mleczko J., Xia Y., Dai R., Wang D., Yang Y.T., Xu M., Fish K., Hof P.R., Warrell J., Fitzgerald D., White K., Jaffe A.E., PsychENCODE Consortium, Peters M.A., Gerstein M., Liu C., Iakoucheva L. M., Pinto D., Geschwind D.H. // *Science*. – 2018. – V. 362 (6420). – P. eaat8127.
73. Garcia-Bea, A. Serotonin 5-HT_{2A} receptor expression and functionality in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: Selective biased agonism via Gα_{i1}-proteins / Garcia-Bea A., Miranda-Azpiazu P., Muguruca C., Marmolejo-Martines-Artesero S., Diez-Alarcia R., Gabilondo A. M., Callado L. F., Morentin B., Gonzalez-Maeso J., Meana J. J. // *European Neuropsychopharmacology*. – 2019. – V. 29. – P. 1453-1463.
74. Gardiner, E. Antipsychotic drug-associated gene–miRNA interaction in T-lymphocytes / Gardiner E., Carroll A., Tooney P. A., Cairns M. J. // *International Journal of Neuropsychopharmacology*. – 2014. – V. 17(6). – P. 929-943.
75. Genis-Mendoza, A. D. Genetic association analysis of 5-HT_{2A} gene variants in eating disorders in a Mexican population / Genis-Mendoza A. D., Ruiz-Ramos D., Lopez-Narvaez M. L., Tovilla-Zarate C. A., Rosa

- Garcia A. R., Cortes Meda G., Martinez-Magana J. J., Gonzalez-Castro T. B., Juarez-Rojop I. E. Nicolini H. // *Brain and Behavior*. – 2019. – V. 9. – P. e01286.
76. Geyer, M. A. Serotonin research: contributions to understanding psychoses / Geyer M. A., Vollenweider F. X. // *Trends Pharmacol Res*. – 2008. – V. 29. – P. 445-453.
77. Gonzalez-Maeso, J. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways to affect behavior / Gonzalez-Maeso J., Weisstaub N. V., Zhou M., Chan P., Ivic L., Ang R., Lira A., Bradley-Moore M., Ge Y., Zhou Q., Sealfon S. C., Gingrich J. A. // *Neuron*. – 2007. – V. 53. – P. 439-452.
78. Gray, J. C. Genetic analysis of impulsive personality traits: Examination of a priori candidates and genome-wide variation / Gray J. C., MacKillop J., Weafer J., Hernandez K. M., Gao J., Palmer A. A., de Wit H. // *Psychiatry Research*. – 2018. – V. 259. – P. 398-404.
79. Grunina, M.N. Aberrant alternative splicing of HTR_{2A} exon II in peripheral blood lymphocytes of drug-naïve schizophrenic patients / Grunina M.N., Belinskaia M.A., Zhuravlev A.S., Nasyrova R.F., Krupitsky E.M., Taraskina A.E., Zabolotina A.M. // *Heliyon*. – 2020. – 6(12). – P. e05809.
80. Guiard, B. P. Central serotonin-2A (5-HT_{2A}) receptor dysfunction in depression and epilepsy: the missing link? / Guiard B. P., Di Giovanni G. // *Front Pharmacol*. – 2015. – V. 6. – P. 46.
81. Hensler, J. G. Catecholamine/Serotonin interactions: systems thinking for brain function and disease / Hensler J. G., Artigas F., Bortolozzi A., Daws L. C., De Deurwaerdere P., Milan L., Navailles S., Koek W. // *Adv Pharmacol*. – 2013. – V. 68. – P. 167-197.
82. Herr, N. The effects of Serotonin in immune Cells / Herr N., Bode C., Duerschmied D. // *Front. Cardiovasc. Med*. – 2017. – V. 4 – P. 48.

83. Hjorthøj, C. Years of potential life lost and life expectancy in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis / Hjorthøj C., Stürup A. E., McGrath J. J., Nordentoft M. // *Lancet Psychiatry*. – 2017. – V. 4(4). – P. 295-301.
84. Howes, O. D. Treatment-Resistant Schizophrenia: Treatment Response and Resistance in Psychosis (TRRIP) Working Group Consensus Guidelines on Diagnosis and Terminology / Howes O. D., McCutcheon R., Agid O., de Bartolomeis A., van Beveren N. J., Birnbaum M. L., Bloomfield M. A., Bressan R. A., Buchanan R. W., Carpenter W. T., Castle D. J., Citrome L., Daskalakis Z. J., Davidson M., Drake R. J., Dursun S., Ebdrup B. H., Elkis H., Falkai P., Fleischacker W. W., Gadelha A., Gaughran F., Glenthøj B. Y., Graff-Guerrero A., Hallak J. E., Honer W. G., Kennedy J., Kinon B. J., Lawrie S. M., Lee J., Leweke F. M., MacCabe J. H., McNabb C. B., Meltzer H., Möller H. J., Nakajima S., Pantelis C., Reis Marques T., Remington G., Rossell S. L., Russell B. R., Siu C. O., Suzuki T., Sommer I. E., Taylor D., Thomas N., Üçok A., Umbricht D., Walters J. T., Kane J., Correll C. U. // *Am J Psychiatry*. – 2017. – V 174(3). – P. 216-229.
85. Howes, O. D. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model / Howes O. D., Murray R. M. // *Lancet*. – 2014. – V. 383(9929) – P. 1677-1687.
86. J., Hu. Stochastic principles governing alternative splicing of RNA / J. Hu, E. Boritz, W. Wylie, D. C. Douek // *PLoS Comput. Biol.* – 2017. – V. 13(9). – P. e1005761.
87. Jimenez, J. P. Psychotherapy and genetic neuroscience: an emerging dialog / Jimenez J. P., Botto A., Herrera L., Leighton C., Rossi J. L., Quevedo Y., Sliva J. R., Martinez F., Assar R., Salazar L. A., Ortiz M., Rios U., Barros P., Jaramillo K., Luyten P. // *Frontiers in Genetics*. – 2018. – V. 9. – P. 257.
88. Kaar, S. J. Antipsychotics: Mechanisms underlying clinical response and side-effects and novel treatment approaches based on pathophysiology /

- Kaar S. J., Natesan S., McCutcheon R., Howes O. D. // *Neuropharmacology*. – 2020. – V. 172. – P. 107704.
89. Kaur, G. An association study of dopaminergic (DRD2) and serotonergic (5-HT2) gene polymorphism and schizophrenia in a North Indian population / Kaur G., Singh Chavan B., Gupta D., Sinhmar V., Prasad R., Tripathi A., Garg P. D., Gupta R., Khurana H., Gautam S., Margoob M. A., Aneja J. // *Asian Journal of Psychiatry*. – 2018. – V. 39. – P. 178-184.
90. Kay, S. R. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia / Kay S. R., Fiszbein A., Opler L.A. // *Schizophr Bull*. – 1987. – V. 13(2). – P. 261-76.
91. Kennedy, B. K. Geroscience: linking aging to chronic disease / Kennedy B. K., Berger S. L, Brunet A., Campisi J., Cuervo A. M., Epel E. S., Franceschi C., Lithgow G. J., Morimoto R. I., Pessin J. E, Rando T. A., Richardson A., Schadt E. E., Wyss-Coray T., Sierra F. // *Cell*. – 2014. – V. 159(4). – P. 709-13.
92. Kennedy, M. J. Personalized medicines – are pharmacists ready for the challenge? / Kennedy M. J. // *Integrated Pharmacy Research and Practice*. – 2018. – V. 7. – P. 113-123.
93. Khandaker, G. M. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment / Khandaker G. M., Cousins L., Deakin J., Lennox B. R., Yolken R. & Jones P. B. // *The Lancet Psychiatry*. – 2015. – V. 2(3). – P. 258–270.
94. Khandaker, G. M. Childhood infection and adult schizophrenia: a meta-analysis of population-based studies / Khandaker G. M., Zimbron J., Dalman C., Lewis G., Jones P. B. // *Schizophrenia research*. – 2012. – V. 139 (1-3). – P. 161-168.
95. Khundakar, A. A. Biphasic change in BDNF gene expression following antidepressant drug treatment explained by differential transcript regulation

- / Khundakar A. A., Zetterström T. S. C. // *Brain Res.* – 2006. – V. 1106(1). – P. 12-20.
96. Kimura, K. T. Structures of the 5-HT_{2A} receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine / Kimura K. T., Asada H., Inoue A., Kadji F. M. N., Im D., Mori C., Arakawa T., Hirata K., Nomura Y., Nomura N., Aoki J., Iwata S., Shimamura T. // *Nat Struct Mol Biol.* – 2019. – V. 26. – P. 121-128.
97. Komor, M. A. Identification of differentially expressed splice variants by the proteogenomic pipeline Splicify / Komor M. A., Pham T. V., Hiemstra A. C., Piersma S. R., Bolijn A. S., Schelfhorst T., Delis-van Diemen P. M., Tijssen M., Sebra R. P., Ashby M., Meijer G.A., Jimenez C.R., Fijneman R.J.A. // *Mol. Cell Proteomics.* – 2017. – V. 16(10). – P. 1850-1863.
98. Kraus, C. Serotonin and neuroplasticity – link between molecular, functional and structural pathophysiology in depression. / Kraus C., Castren E., Kasper S., Lanzenberger R. // *Neuroscience and biobehavioral reviews.* – 2017. – V. 77. – P. 317-326.
99. Kroken, R. A. Constructing the immune signature of schizophrenia for clinical use and research; an integrative review translating descriptives into diagnostics / Kroken R. A., Sommer I. E., Steen V. M., Dieset I., Johnsen E. // *Front Psychiatry.* – 2019. – V. 9. – P. 753.
100. Kuzman, M. R. Genome-wide expression analysis of peripheral blood identifies candidate biomarkers for schizophrenia / Kuzman M. R., Medved V., Terzic J., Krainc D. // *J Psychiatr Res.* – 2009. – V. 43(13). – P. 1073-1077.
101. Lai, C.-Y. Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics / Lai C.-Y., Scarr E., Udawela M., Everall I., Chen W. J., Dean B. // *World. J. Psychiatr.* – 2014. – V. 6. № 1. – P. 102-117.
102. Lally, J. Two distinct patterns of treatment resistance: clinical predictors of treatment resistance in first-episode schizophrenia spectrum psychoses /

- Lally J., Ajnakina O., Di Forti M., Trotta A., Demjaha A., Kolliakou A., Mondelli V., Reis Marques T., Pariante C., Dazzan P., Shergil S. S., Howes O. D., David A. S., MacCabe J. H., Gaughran F., Murray R. M. // *Psychol Med.* – 2016. – V. 46(15). – P. 3231-3240.
103. Latorre, E. Alternative splicing in serotonergic system: Implications in neuropsychiatric disorders / Latorre E., Mesonero J. E., Harries L. W. // *J Psychopharmacology.* – 2019. – V. 33(11). – P. 1352-1363.
104. Lee, S. C. Therapeutic targeting of splicing in cancer / Lee S. C., Abdel-Wahab O. // *Nat Med.* – 2016. – V. 22(9). – P. 976-986.
105. Levite, M. Dopamine and T cells: dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases / Levite M. // *Acta Physiol.* – 2016. – Vol. 216. – P. 42-89.
106. Lewis, D. A. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology / Lewis D. A., Lieberman J. A. // *Neuron.* – 2000. – V. 28(2). P. 325-34.
107. Lewis, S. W. Fast Facts: Schizophrenia fourth edition / Lewis S. W. // Shon W. Lewis, Robert W. Buchanan. – Health Press Limited in S. Karger AG, 2015. – 120.
108. Li, Z. COMT, 5-HTR2A, and SLC6A4 mRNA Expressions in First-Episode Antipsychotic-Naïve Schizophrenia and Association With Treatment Outcomes / Li Z., He Y., Han H., Zhou Y., Ma X., Wang D., Zhou J., Ren H., Yuan L., Tang J., Zong X., Hu M., Chen X. // *Front Psychiatry.* – 2018. – V.9. – P. 577.
109. Liu, J. Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals / Liu J., Lewohl J. M., Harris R. A., Iyer V. R., Dodd P. R., Randall P. K., Mayfield R. D. // *Neuropsychopharmacology.* – 2006. – V. 31. – P. 1574-1582.

110. Liu, L. Identification of the mRNA expression status of the dopamine D2 receptor and dopamine transporter in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients / Liu L., Yuan G., Cheng Z., Zhang G., Liu X., Zhang H. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8 № 9. – P. 1-6.
111. Loonen, A. J. Circuits regulating pleasure and happiness – mechanisms of depression / Loonen A. J., Ivanova S. A. // *Frontiers in Human Neuroscience*. – 2016. – V.10. – P. 571.
112. Lopez-Moreno, J. A. Histone Deacetylase Gene Expression Following Binge Alcohol Consumption in Rats and Humans / Lopez-Moreno J. A., Marcos M., Calleja-Conde J., Echeverry-Alzate V., Buhler K. M., Costa-Alba P., Bernardo E., Laso F. J., Rodriguez de Fonseca F., Nadal R., Viveros M. P., Maldonado R., Gine E. // *Alcohol Clin Exp Res*. – 2015. – V. 39. – P. 1939-1950.
113. Malkova, N. V. Manganese-enhanced magnetic resonance imaging reveals increased DOI-induced brain activity in a mouse model of schizophrenia / Malkova N. V., Gallagher J. J., Yu C. Z., Jacobs R. E., Patterson P. H. // *Proc Natl Sci USA*. – 2014. – V. 111. – P. E2492-E2500.
114. Marballi, K. Alcohol consumption induces global gene expression changes in VTA dopaminergic neurons / Marballi K., Genabai N.K., Blednov Y.A., Harris R.A., Ponomarev I. // *Genes Brain Behav*. – 2016. – V. 15(3). – P. 318-326.
115. Masana, M. Dopamine neurotransmission and atypical antipsychotics in prefrontal cortex: a critical review / Masana M., Santana N., Artigas F., Bortolozzi A. // *Curr Top Med Chem*. – 2012. – V. 12(21). – P. 2357-2374.
116. McCorvy, J. D. Structure and function of serotonin G protein coupled receptors / McCorvy J. D., Roth B. L. // *Pharmacol Ther*. – 2015. – V. 150. – P. 129-142.
117. McKenna, F. Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow

- cytometric study / McKenna F., McLaughlin P. J., Lewis B. J., Sibbring G. C., Cummerson J. A., Bowen-Jones D., Moots R. J. // *J. Neuroimmunol.* – 2002. – Vol. 132 № 1-2. – P. 34-40.
118. Meltzer, H. Y. Update on Typical and Atypical Antipsychotic Drugs. / Meltzer H. Y. // *Annu. Rev. Med.* – 2013. – V. 64. – P. 393-406.
119. Meredith, C. W. Implications of chronic methamphetamine use: a literature review / Meredith C. W., Jaffe C., Ang-Lee K., Saxon A. J. // *Harv Rev Psychiatry.* – 2005. – V. 13(3). – P. 141-154.
120. Millan, M. J. Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions / Millan M. J., Marin P., Bockaert J., Mannoury la Cour C. // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2008. – V. 29. – P. 454-464.
121. Miller, B. J. Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects / Miller B. J., Buckley P., Seabolt W., Mellor A., Kirkpatrick B. // *Biol Psychiatry.* – 2011. – V. 70(7). – P. 663-671.
122. Mittal, R. Neurotransmitters: The critical modulators regulating gut-brain axis / Mittal R., Debs L. H., Patel A. P., Nguyen D., Patel K., O'Connor G., Grati M., Mittal J., Yan D., Eshraghi A. A., Deo S. K., Daunert S., Liu X. Z. // *J Cell Physiol.* – 2017. – V. 232(9). – P. 2359-2372.
123. Mohammadi, A. Brain, blood, cerebrospinal fluid, and serum biomarkers in schizophrenia / Mohammadi A., Rashidi E., Amooeian V. G. // *Psychiatry Res.* – 2018. V.265. – P. 25-38.
124. Mohammad-Zadeh, L. F. Serotonin: a review / Mohammad-Zadeh L. F., Moses L., Gwaltney-Brant S. M. // *J vet Pharmacol Therap.* – 2008. – V. 31. – P. 187-199.
125. Monji, A. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia / Monji A., Kato T., Kanba S. // *Psychiatry Clin Neurosci.* – 2009. – V. 63. – P. 257-265.

126. Najjar, S. Neuroinflammation and white matter pathology in schizophrenia: systematic review / Najjar S., Pearlman D. M. // *Schizophr Res.* – 2015. – V. 161(1). – P. 102-112.
127. Nichols, D. E. Serotonin receptors / Nichols D. E., Nichols C. D. // *Chem Rev.* – 2008. – V. 108(5). – P. 1614-1641.
128. Novick, D. Predictors and clinical consequences of non-adherence with antipsychotic medication in the outpatient treatment of schizophrenia / Novick D., Haro J. M., Suarez D., Perez V., Dittmann R.W., Haddad P. M. // *Psychiatry Res.* – 2010. – V.176 (2-3) – P.109-113.
129. Numata, S. Gene expression in the peripheral leukocytes and association analysis of PDLIM5 gene in schizophrenia / Numata S., Ueno S., Iga J., Yamauchi K., Hongwei S., Hashimoto R., Takeda M., Kunugi H., Itakura M., Ohmori T. // *Neurosci Lett.* – 2007. – V. 415(1). – P. 28-33.
130. Numata, S. TGFBR2 gene expression and genetic association with schizophrenia / Numata S., Ueno S., Iga J., Yamauchi K., Hongwei S., Hashimoto R., Takeda M., Kunugi H., Itakura M., Ohmori T. // *J Psychiatr Res.* – 2008. – V. 42(6). – P. 425-432.
131. Nunez, Y. O. Understanding Alcoholism Through microRNA Signatures in Brains of Human Alcoholics / Nunez Y. O, Mayfield R. D. // *Front Genet.* – 2012. – V. 3. – P. 43.
132. Oldham, M. C. Functional organization of the transcriptome in human brain / Oldham M. C., Konopka G., Iwamoto K., Langfelder P., Kato T., Horvath S., Geschwind D.H. // *Nat Neurosci.* – 2008. – V. 11. – P. 1271-1282.
133. Oldmeadow, C. Combined analysis of exon splicing and genome wide polymorphism data predict schizophrenia risk loci / Oldmeadow C., Mossman D., Evans T. J., Holliday E. G., Tooney P. A., Cairns M. J., Wu J., Carr V., Attia J. R., Scott R. J. // *J Psychiatr Res.* – 2014. – V. 52. – P. 44-49.

134. Pacheco, R. The dopaminergic system in autoimmune diseases / Pacheco R., Contreras F., Zouali M. // *Frontiers in immunology*. – 2014. – V.5. Article 117. – P. 1-17.
135. Pandey, S. C. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism / Pandey S. C., Ugale R., Zhang H., Tang L., Prakash A. // *J Neurosci*. – 2008. – V. 28. – P. 3729-3737.
136. Pellicano, C. The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders / Pellicano C., Pontieri F. E., Fanciulli A., Buttarelli F. R. // *Current Neuropharmacology*. – 2011. – V. 9. – P. 278-288.
137. Pepper, E. J. Associations between risk factors for schizophrenia and concordance in four monozygotic twin samples / Pepper E. J., Pathmanathan S., McIlrae S., Rehman F. U., Cardno A. G. // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* – 2018. – V. 177 № 5. – P. 503-510.
138. Perry, V.H. Microglia in neurodegenerative disease / Perry VHNicoll J. A., Holmes C. // *NatRev Neurol*. – 2010. – V. 6. – P. 193-201.
139. Pogarell, O. Dopaminergic neurotransmission in patients with schizophrenia in relation to positive and negative symptoms / Pogarell O., Koch W., Karch S., Dehning S., Müller N., Tatsch K., Poepperl G., Möller H. J. // *Pharmacopsychiatry*. – 2012. – V. 45 Suppl 1. – P. 36-41.
140. Ponomarev, I. Amygdala transcriptome and cellular mechanisms underlying stress-enhanced fear learning in a rat model of posttraumatic stress disorder / Ponomarev I., Rau V., Eger E. I., Harris R. A., Fanselow M. S. // *Neuropsychopharmacology*. – 2010. – V. 35. – P. 1402-1411.
141. Ponomarev, I. Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence / Ponomarev I., Wang S., Zhang L., Harris R. A., Mayfield R. D. // *J Neurosci*. – 2012. – V. 32. – P.1884-1897.

142. Pouget, J. G. Pharmacogenetics of antipsychotic treatment in schizophrenia / Pouget J. G., Müller D. J. // *Methods Mol Biol.* – 2014. – V. 1175. – P. 557-587.
143. Preller, K. H. Role of the 5-HT_{2A} receptor in self- and other-initiated social interaction in lysergic acid diethylamide-induced states: a pharmacological fMRI study / Preller K. H., Schilbach L., Pokorny T., Flemming J., Seifritz E., Vollenweider F. X. // *J Neurosci.* – 2018. – V. 38. – P. 3603-3611.
144. Rampino, A. Antipsychotic drug responsiveness and dopamine receptor signaling; old players and new prospects / Rampino A., Marakhovskaia A., Soares-Silva T., Torretta S., Veneziani F., Beaulieu J. M. // *Frontier in Psychiatry.* – 2019. – V. 9. – Article 702.
145. Raote, I. Serotonin 2A (5-HT_{2A}) Receptor Function: Ligand-Dependent Mechanisms and Pathways // *Serotonin Receptors in Neurobiology* / Raote I., Bhattacharya A., Panicker M. M. // Ed A. Chattopadhyay. Boca Raton, 2007. Chapter 6.
146. Reble, E. The contribution of alternative splicing to genetic risk for psychiatric disorders / Reble E., Dineen A., Barr C. L. // *Genes Brain Behav.* – 2018. – Vol. 17 № 3. – P. e12430.
147. Réus, G. Z. The role of inflammation and microglial activation in the pathophysiology of psychiatric disorders / Réus G. Z., Fries G. R., Stertz L., Badawy M., Passos I. C., Barichello T., Kapczinski F., Quevedo J. // *Neuroscience.* – 2015. – V. 300. – P. 141-54.
148. Revier, C. J. Ten-Year Outcomes of First-Episode Psychoses in the MRC ÆSOP-10 Study / Revier C. J., Reininghaus U., Dutta R., Fearon P., Murray R. M., Doody G. A., Croudace T., Dazzan P., Heslin M., Onyejiaka A., Kravariti E., Lappin J., Lomas B., Kirkbride J. B., Donoghue K., Morgan C., Jones P. B. // *J Nerv Ment Dis.* – 2015. – V. 203(5). – P. 379-386.
149. Rivera-Baltanas, T. Serotonin 2A receptor clustering in peripheral lymphocytes is altered in major depression and may be a biomarker of

- therapeutic efficacy / Rivera-Baltanas T., Olivares J. M., Martinez-Villamarin J. R., Fenton E. Y., Kalynchuk L. E., Caruncho H. J. // *Journal of Affective Disorders*. – 2014. – V. 163. – P. 47-55.
150. Rodrigo, A. 5-Hydroxytryptamine receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. / Rodrigo A., Nicholas M. B., Gordon B., Joel B., Theresa B., Amy B., Marlene L. C., Aline D., Richard M. E, Manfred G., Mark H., Michel H., Paul R. H., René H., Julie H., Katharine H. D., Rebecca H., Daniel H., Patrick P. A. H., Klaus Peter L., Luc M., Graeme R. M, Derek N. M, Ewan M., John N., Stephen J. P., John A. P., Bryan R., Pramod R. S., Trevor S., Andrew S., Carlos M. V., Frank Y. // *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE*. 2019; 2019(4). Available from: <https://doi.org/10.2218/gtopdb/F1/2019.4>.
151. Rodrigues-Amorim, D. Cytokines dysregulation in schizophrenia: A systematic review of psychoneuroimmune relationship / Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., Spuch C., Caruncho H. J., González-Fernández Á., Olivares J. M., Agís-Balboa R. C. // *Schizophr Res*. – 2018. – V. 197. – P.19-33.
152. Rojo, L. E. Metabolic syndrome and obesity among users of second generation antipsychotics: A global challenge for modern psychopharmacology. / Rojo L. E., Gaspar P. A., Silva H., Risco L., Arena P., Cubillos-Robles K., Jara B. // *Pharmacol Res*. – 2015. – V. 101. – P. 74-85.
153. Ruble, C. L. Genomic structure and expression of the human serotonin 2A receptor gene (HTR2A) locus: identification of novel HTR2A and antisense (HTR2A-AS1) exons / Ruble C. L., Smith R. M., Calley J., Munsie L., Airey D. C., Gao Y., Shin J. H., Hyde T. M., Straub R. E., Weinberger D. R., Nisenbaum L. K. // *BMC Genet*. – 2016. – V. 17:16.
154. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, Ripke S., Neale B. M., Corvin A. et al. / *Biological insights from 108*

- schizophrenia-associated genetic loci // Nature. – 2014. – Vol. 511. – P. 421-427.
155. Schulz, C. Safety of olanzapine use in adolescents / Schulz C., Haight R. J. // Expert Opin. Drug Saf. – 2013. – V. 12. – P. 777-782.
156. Schwarz, M. J. 2001. The Th2-hypothesis of schizophrenia: A strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms / Schwarz M. J., Muller N., Riedel M., Ackenheil M. // Med Hypotheses. – V. 56. – P. 483-486.
157. Seidman, L. J. Evolving Notions of Schizophrenia as a Developmental Neurocognitive Disorder / Seidman L. J., Mirsky A. F. // J Int Neuropsychol Soc. – 2017 – V. 23(9-10). – P. 881-892.
158. Serretti, A. HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies / Serretti A., Drago A., De Ronchi D. // Curr Med Chem. – 2007. – V. 14(19). – P. 2053-2069.
159. Singh, A. N. Effect of loxapine on peripheral dopamine-like and serotonin receptors in patients with schizophrenia / Singh A. N., Barlas C., Saeedi H., Mishra R. K. // J. Psychiatry Neurosci. - 2003. – Vol. 28, № 1. – P. 39-47.
160. Sinopoli, V. M. A review of the role of serotonin system genes in obsessive-compulsive disorder / Sinopoli V. M., Burton C. L., Kronenberg S., Arnold P. D. // Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2017. – V. 80. – P. 372-381.
161. Smith, A. K. Genetic evaluation of the serotonergic system in chronic fatigue syndrome / Smith A. K., Dimulescu I., Falkenberg V. R., Narasimhan S., Heim C., Vernon S. D., Rajeevan M. S. // Psychoneuroendocrinology. – 2008. – V. 33(2). – P. 188-197.
162. Smith, R. M. Family-based clinical associations and functional characterization of the serotonin. / Smith R. M., Banks W., Hansen E., Sadee W., Herman G. E.

163. Smith, R. M. Multiple regulatory variants modulate expression of 5-hydroxytryptamine 2A receptors in human cortex / Smith R. M., Papp A. C., Webb A., Ruble C. L., Munsie L. M., Nisenbaum L. K., Kleinman J. E., Lipska B. K., Sadee W. // *Biol Psychiatry*. – 2013. – V. 73(6). – P. 546-554.
164. Smith, R. S. The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: A strategy to identify a subgroup of schizophrenia caused by immune mechanisms / Smith R. S., Maes M. // *Med Hypotheses*. – 1995. – V. 45. – P. 135-141.
165. Soman, S. Dopamine requires unique residues to signal via the serotonin 2A receptor / Soman S., Bhattacharya A., Panicker M. M. // *Neuroscience*. – 2020. – V. 439. – P. 319-331.
166. Stahl, S. M. Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical application. 3d ed / Stahl S. M. // Stephen M. Stahl; with illustrations by Nancy Muntner. - 4th ed. – Cambridge University Press. – 2008 – P. 1-608.
167. Sujitha, S. P. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) 2A receptor gene polymorphism is associated with schizophrenia / Sujitha S. P., Nair A., Banerjee M., Lakshmanan S., Harshavaradhan S., Gunasekaran S., Gopinathan A. // *Indian J. Med. Res.* – 2014. – V. 140. P. 736–743.
168. Sun. Meta-analysis of polymorphism rs6311 and rs6313 in the 5-HT_{2A}R gene and schizophrenia / Sun, Li & Xu, Ping & Zhou, Yan-Gang & Zuo, Shan-Ru & Liu, Yi-Ping. // *Nordic journal of psychiatry*. – 2016. – V. 71. – P. 1-11.
169. Swathy, B. Haloperidol induces pharmacoepigenetic response by modulating miRNA expression, global DNA methylation and expression profiles of methylation maintenance genes and genes involved in neurotransmission in neuronal cells / Swathy B., Banerjee M. // *PLoS ONE*. – 2017. – V. 12 (9). – P. e0184209.

170. Tao, R. GAD1 alternative transcripts and DNA methylation in human prefrontal cortex and hippocampus in brain development, schizophrenia / Tao R., Davis K. N., Li C., Shin J. H., Gao Y., Jaffe A. E., Gondré-Lewis M. C., Weinberger D. R., Kleinman J. E., Hyde T. M. // *Mol. Psychiatry*. – 2018. – V. 23(6). – P. 1496-1505.
171. Taraskina, A.E. Potential diagnostic markers of olanzapine efficiency for acute psychosis: a focus on peripheral biogenic amines / Taraskina A.E., Nasyrova R.F., Zabolina A.M., Sosin D.N., Sosina K.A., Ershov E.E., Grunina M.N., Krupitsky E.M. // *BMC psychiatry*. – 2017. – P. 17:394.
172. The WHO World Mental Health Survey Consortium. Prevalence, severity and unmet need for treatment of mental disorders in the World Health Organization World Mental Health Surveys/ The WHO World Mental Health Survey Consortium // *JAMA* – 2010. – V. 291 (21). – P. 2581-2590.
173. Tourjman, V. Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: a meta-analysis / Tourjman V., Kouassi É., Koué M. È., Rocchetti M., Fortin-Fournier S., Fusar-Poli P., Potvin S. // *Schizophr Res*. – 2013. – V. 151(1-3). – P. 43-47.
174. Wang, F. DNA co-methylation modules in postmortem prefrontal cortex tissues of European Australians with alcohol use disorders / Wang F., Xu H., Zhao H., Gelernter J., Zhang H. // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6. – P.19430.
175. Wang, J.-R. GSK-3 β interacts with dopamine D1 receptor to regulate receptor function: implication for prefrontal cortical D1 receptor dysfunction in schizophrenia / Wang J.-R., Sun P.-H., Ren Z.-X., Meltzer H.Y., Zhen X.-C. // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. – 2017. – V. 23. – P. 174-187.
176. Wong, A. H. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology / Wong A. H., Van Tol H. H. // *Neurosci Biobehav Rev*. – 2003. – V. 27(3). – P. 269-306.

177. Xu, R. Dopamine D2S and D2L receptors may differentially contribute to the actions of antipsychotic and psychotic agents in mice / Xu R., Hranilovic D., Fetsko L. A., Bucan M., and Wang Y. // *Mol .Psychiatry*. – 2002. – V. 7. – P. 1075-1082.
178. Yao, Y. Verification of proposed peripheral biomarkers in mononuclear cells of individuals with schizophrenia / Yao Y., Schröder J., Karlsson H. // *J Psychiatr Res*. – 2008. – V. 42(8). – P. 639-643.
179. Zhang, J. P. Pharmacogenetics and antipsychotics: therapeutic efficacy and side effects prediction / Zhang J. P., Malhotra A. K. // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. – 2011. – V. 7(1). – P. 9-37.
180. Zhang, L. GC/AT-content spikes as genomic punctuation marks / Zhang L., Kasif S., Cantor C. R., Broude N. E. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – V. 101. – P. 16855-16860.