Министерство образования и науки Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Институт биологии, экологии, почвоведения, сельского и лесного хозяйства
(Биологический институт)
Кафедра цитологии и генетики

ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК

Руководитель ООП
д–р биол. наук
_____ Д.С. Воробьев
«14» 06 2019 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА БАКАЛАВРА

ПОЛИМОРФНЫЕ ВАРИАНТЫ ГЕНОВ *GSK–3β* И *PTPN5* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ МАРКЕРЫ ШИЗОФРЕНИИ

по основной образовательной программе подготовки бакалавров
направление подготовки 06.03.01 – Биология

Борисова Лилия Алексеевна

Руководитель ВКР
д–р мед. наук, профессор
зав. лабораторией молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья Томского НИМЦ
_____ С. А. Иванова
подпись
«14» 06 2019

Автор работы
студентка группы № 01501
_____ Л.А. Борисова
подпись

Томск – 2019

ОТДЕЛ КАДРОВ
подпись Ивановой С.А. заверяю:
Начальник отдела кадров НИИ психического здоровья
Е.А. Фролова «14» 06 2019 г.

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3
ВВЕДЕНИЕ 4
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР 7
1.1 Общая характеристика заболевания 7
1.2 Этиология и патогенез шизофрении 8
1.3 Роль генетики в шизофрении 12
1.4 Характеристика киназы гликогенсинтазы 3β (*GSK–3β*) и ассоциации GSK–3β с развитием шизофрении 13
1.4.1 Общая характеристика *GSK–3β* 13
1.4.2 Анализ исследований связи полиморфизмов гена *GSK–3β* с шизофренией 16
1.5 Характеристика *STEP*(*PTPN5*) тирозинфосфатазы и роль в развитии различных заболеваний 17
1.5.1 Общая характеристика тирозинфосфатазы 17
1.5.2 Участие *STEP* в патогенезе различных психических расстройств 19
1.5.3 Роль тирозинфосфатазы в патогенезе шизофрении 20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 23
2.1 Материалы исследования 23
2.2 Методы исследования 23
2.3 Статистическая обработка результатов 26
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 27
ВЫВОДЫ 33

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

COMT – Катехол–О–метилтрансфераза

FMR1 (fragile X mental retardation 1) – Нарушения в данном гене провоцируют синдром ломкости Х–хромосомы. Продукт FMRP представляет собой РНК-связывающий белок, циркулирующий в клетке между ядром и цитоплазмой. Fyn – нерецепторная тирозинкиназа src-семейства, участвующая в регуляции клеточного роста

GSK–3β – Киназа гликогенсинтазы–3β (*GSK–3β* – продукт гена)

NMDA–рецептор (NMDAR; НМДА-рецептор) – (N-methyl-D-aspartate receptor) ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающий N-метил-D-аспартат (NMDA)

PTPN5 (STEP) – (Protein Tyrosine Phosphatase, Non Receptor Type 5) белок тирозин–фосфатаза нерецепторного типа 5

SNP – (Single nucleotide polymorphism) однонуклеотидный полиморфизм

TLR – (Toll–like receptor, TLR) толл–подобные рецепторы, являются главными компонентами системы врожденного иммунитета, которые опосредуют специфическое распознавание эволюционно консервативных молекулярных структур патогенов

Wnt–сигнальный путь – комбинация Wg (англ. Wingless – ген дрозофил, подавляющий развитие крыльев) и Int (гомологичный ген позвоночных), один из внутриклеточных сигнальных путей животных, регулирующий эмбриогенез, рост и дифференцировку клеток

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГАМК – Гамма–аминомасляная кислота

МКБ-10 – Международная классификация болезней десятого пересмотра

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения – эндогенное прогредиентное психическое расстройство, которое характеризуется диссоциацией психических функций, приводящей к дефекту личности в эмоционально–волевой сфере и разнообразным психопатологическим расстройствам (Крук И. В. и др., 1995).

По данным ВОЗ на апрель 2016 года во всем мире число больных шизофренией превышало 21 миллион человек (Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] // Главная страница/ Центр СМИ / Информационные бюллетени / шизофрения. ВОЗ, 2019. Доступ. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia, 2018).

Шизофрения характеризуется специфической гетерогенной симптоматикой, сочетающей позитивные, негативные симптомы, когнитивные нарушения и расстройства поведения. Также данное заболевание обычно сопровождается рядом осложнений, в том числе коморбидными болезнями, среди которых встречаются соматические, инфекционные, психические заболевания (Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] // Главная страница/ Центр СМИ / Информационные бюллетени / шизофрения. ВОЗ, 2019. Доступ. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia, 2018; Green A. I. et al., 2003).

Шизофрения служит причиной нарушения социально–трудовой адаптации и инвалидизации, что объясняет повышенный риск суицида, алкоголизма и наркомании среди пациентов. Кроме того, проблемы положения в обществе и здоровья приводят к сокращению продолжительности жизни и у лиц с шизофренией возрастает вероятность более ранней смерти в 2–2,5 раза по сравнению со здоровыми людьми (Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] // Главная страница/ Центр СМИ / Информационные бюллетени / шизофрения. ВОЗ,

2019. Доступ. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia, 2018; Валентик Ю. В. и др., 2002).

О генетической природе шизофрении известно давно. Выявлен ряд генетических маркеров шизофрении, в частности, гены *GSK–3β* и *PTPN5* (Nadri C. et al., 2003; Федоренко О. Ю. и др., 2013).

На сегодняшний день является актуальным исследование протеинкиназ, участвующих в нейробиологических процессах. Гены, определяющие их синтез, рассматривают в качестве генов–кандидатов предрасположенности к шизофрении. Одной из таких протеинкиназ является фермент киназа гликогенсинтазы–3β (*GSK–3β*). Она представляет собой большой интерес, так как регулирует активность более 50 белков и сама зависит от большого количества внеклеточных стимулов, что обусловливает ее ключевое положение в большинстве клеточных механизмов.

GSK–3β участвует в регуляции процессов метаболизма, апоптоза, клеточной пролиферации, клеточного цикла, эмбриогенеза, нейротрансмиссии, нейродегенерации, нейрональной полярности, синаптической пластичности, циркадианных ритмов.

Исследования по изучению ассоциаций гена *GSK–3β* с шизофренией немногочисленны. Считается, что полиморфные варианты генов, ассоциированные с заболеванием, могут обладать измененной функциональной активностью. Недостаточно изучена связь *GSK–3β* с клиническим полиморфизмом психических расстройств и применяемой фармакотерапией (Иванова С. А. и др., 2014).

Тем не менее, анализ данных литературы свидетельствует о существенной роли нарушения функциональной активности *GSK–3β* в патогенезе шизофрении и возможности использования киназы в качестве молекулярной мишени для разработки терапевтических стратегий. Поэтому сейчас активно ведутся поиски ассоциаций *GSK–3β* с психическими расстройствами (Иванова С. А. и др., 2014).

В свою очередь, продукт *PTNP5*(*STEP*) относится к семейству внутриклеточных тирозинфосфатаз. Данный фермент обеспечивает преобразование ключевых молекул, необходимых для осуществления функционирования нейронов, в том числе и процесса синаптической пластичности.

Химическая активность тирозинфосфатазы заключается в способности связывать и дефосфорилировать субстраты. Известно, что дисбаланс *STEP* является основой патологических молекулярных процессов, служащих причиной возникновения ряда заболеваний, в том числе и шизофрении. На настоящий момент, активно ведутся поиски ассоциаций полиморфных вариантов *STEP* с различными психическими заболеваниями (Nguyen T. et al., 2002; Goebel-Goody S. M. et al., 2012).

Цель исследования: исследование полиморфных вариантов генов *GSK–3β* и *PTNP5* как вероятных маркеров шизофрении.

Задачи исследования:

1. Оценить ассоциацию rs334558 гена *GSK–3β* с развитием шизофрении;
2. Исследовать возможную связь генотипов и аллелей rs334558 гена *GSK–3β* с позитивной и негативной симптоматикой у пациентов с параноидной шизофренией;
3. Оценить ассоциацию rs4075664 гена *PTNP5* с развитием шизофрении;
4. Исследовать возможную связь генотипов и аллелей rs4075664 гена *PTNP5* с позитивной и негативной симптоматикой у пациентов с параноидной шизофренией.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Общая характеристика заболевания

В 1898 году немецкий психиатр Эмиль Крепелин объединил ряд психических расстройств в единую группу под названием «Dementia praecox», основываясь на характере течения и сходных итогах заболеваний (Гаррабе Ж., 2000). Позже в 1911 году француз Эйген Блейлер предложил новое название, так в психиатрии появился термин шизофрения (Гаррабе Ж., 2000). Кроме того Э. Блейлер описал ряд характерных для данной болезни симптомов, которые стали основой современной симптоматики (Узлов Н. Д., 2009).

Понятие шизофрения происходит от древнегреческого и означает: «schizo – разделяю, расщепляю и phren – ум, мысль», дословно – расщепление рассудка. Блейлер считал основным признаком болезни схизис или нарушение единства психических процессов (Гаррабе Ж., 2000; Узлов Н. Д., 2009).

Клиническая картина шизофрении сочетает в себе ряд симптомов (продуктивные и негативные), также к данным проявлениям относят когнитивные расстройства и кататонические синдромы (Bolkan S. et al., 2016; Owen M. J. et al., 2016).

Продуктивные нарушения определяют искажение нормального восприятия, включают бред, галлюцинации, расстройство мышления (Bolkan S. et al., 2016; Owen M. J. et al., 2016). Наличие положительных симптомов является предпосылкой для диагностики, поскольку чаще всего служат доминирующей характеристикой, обычно ассоциированной с шизофренией (Bolkan S. et al., 2016).

Тем не менее, у части пациентов также проявляются нарушения в ряде социальных, эмоциональных и когнитивных форм поведения. Эти симптомы классифицируются, как негативные и включают снижение аффекта, безволие,

аутизм, эмоциональное оскудение и т. д. (Bolkan S. et al., 2016). Негативные симптомы могут переходить в хроническую форму. При неблагоприятном течении и без своевременной помощи у пациента может возникнуть шизофренический дефект (Жмуров В. А., 2012). Соотношение и представленность вышеупомянутых симптомов в психическом состоянии больного зависят от прогредиентности и формы заболевания. На сегодняшний день выделяют девять форм шизофрении, диагностику которых проводят на основании критериев МКБ–10 (МКБ 10 – Международная классификация болезней 10–го пересмотра. Шизофрения (F20) [Электронный ресурс]. 2018. Доступ. URL:http://mkb–10.com/index.php?pid=4161, 2018).

Распространенность данной болезни во всем мире варьирует, что обусловлено разными диагностическими подходами, особенностями учета пациентов, этнокультурными, социальными факторами, воздействием окружающей среды и другими.

Однако обнаружено, что эпидемиология заболевания не зависит от степени развитости стран, отличие состоит в представленности тех или иных форм расстройства. Например, в развивающихся странах кататония встречается чаще, чем в развитых, а гебефрения – наоборот (Bhugra D., 2005). Некоторые исследования свидетельствуют о независимости шизофрении от половой принадлежности (Bhugra D., 2005).

1.2 Этиология и патогенез шизофрении

Существует множество теорий патогенеза шизофрении, но, несмотря на обилие научных фактов, лежащих в их основе, каждая из них имеет свои недостатки и противоречия. Вследствие этого до сих пор не существует единой концепции этиологии и патогенеза шизофрении.

В современной психиатрии выделяют две основные группы теорий развития данного заболевания – биологические и теории психогенеза (Снежевский А. В. и др., 2012).

Биологические теории объединяют генетические аспекты заболевания, нейробиологические концепции, дизонтогенетическую теорию, иммунологические теории и т. д. (Юрьева Л. Н. и др., 2010; Полянский Д. А. и др., 2015).

В настоящее время широко распространены нейробиологические теории, объединяющие в себе нейрохимические и нейроанатомические гипотезы. Последние рассматривают причину шизофрении в патологиях работы головного мозга (Юрьева Л. Н. и др., 2010; Нестерович А. Н. и др., 2015). Обнаружено, что продуктивная симптоматика при шизофрении вызвана расстройством хвостатого ядра, лимбической системы и аномалиями височной коры (Юрьева Л. Н. и др., 2010). В свою очередь, негативную симптоматику, по результатам различных исследований, связывают со сниженной активностью различных участков префронтальной коры (ПФК) (Нестерович А. Н. и др., 2015) и уменьшением объема серого вещества ПФК в целом, также специфическим считают повышение активности левой височной доли головного мозга и увеличение кровотока в хвостатом ядре. Некоторые исследователи видят корреляцию заболевания с уменьшением объема серого вещества височной коры и сниженным объемом таламуса. Однако накопленные данные довольно противоречивы, например, продуктивную симптоматику связывают как с увеличением общего объема мозга, так и с его уменьшением (Нестерович А. Н. и др., 2015). Следует упомянуть, что до сих пор не найдено статистической корреляции между диагнозом и морфофункциональными изменениями мозга. Предполагается, что это зависит от формы шизофрении (Нестерович А. Н. и др., 2015; Howes O. et al., 2016).

В свою очередь, нейрохимические теории рассматривают шизофрению как последствия дисфункций метаболизма (Юрьева Л. Н. и др., 2010). Исследования нарушений работы некоторых нейротрансмиттеров (дофамина, серотонина, ГАМК, глутамата, норадреналина, ацетилхолина), привели к появлению одноименных теорий (Полянский Д. А. и др., 2015), из которых в

настоящее время самой популярной является дофаминергическая теория (Карлссон А., 1960). В её основе лежат следующие факты:

- Клинически эффективные нейролептики, относящиеся к разным химическим группам (фенотиазины, бутирофеноны, тиоксантены и др.), способны блокировать дофаминовые рецепторы;
- Агонисты дофамина могут вызывать симптомы шизофрении у здоровых людей и ухудшать состояние больных.

Дизонтогенетическая теория или теория нарушения развития мозга предполагает, что шизофрения есть патология, развивающаяся в пренатальном периоде под влиянием различных факторов (генетических, токсических, вирусных и т. д.). При этом нарушение проявляется не в грубых морфофункциональных аномалиях, а на клеточном и субклеточном уровнях (Снежевский А. В. и др., 2012; Howes O. et al., 2016).

Иммунологические теории характеризуют шизофрению как инфекционное заболевание, что объясняется присутствием у больных антител к собственным мозговым антигенам (Полянский Д. А. и др., 2015; Юрьева Л. Н. и др., 2010; Снежевский А. В. и др., 2012). Помимо этого происходит снижение числа Т–киллеров (Юрьева Л. Н. и др., 2010; Снежевский А. В. и др., 2012).

Следует отметить, что ни одна из вышеупомянутых теорий не является независимой, поскольку существующие данные довольно противоречивы, и в настоящий момент нет определяющей этиологию шизофрении теории.

Теории психогенеза рассматривают особенности личности и её формирование в различных аспектах, основываясь на психоанализе Фрейда и «психобиологической теории» Майера (Юрьева Л. Н. и др., 2010). Сторонники этих теорий ключевую роль отдают семейным взаимоотношениям и объясняют заболевание событиями детства: нарушение контакта между матерью и младенцем, подражание поведению родителей, «псевдовзаимные»/ «псевдовраждебные» способы взаимодействия членов семьи т. д. (Юрьева Л. Н. и др., 2010). Считается, что дети, воспитывающиеся

в таких семьях, в последующем неспособны полностью адаптироваться к требованиям социума и демонстрируют неадекватное поведение (Юрьева Л. Н. и др., 2010). Все теории психогенеза шизофрении недостаточно обоснованы научными наблюдениями (Снежевский А. В. и др., 2012), однако они остаются распространенными за рубежом (Снежевский А. В. и др., 2012).

В результате многочисленных исследований обнаружено, что наследственные факторы играют существенную роль в этиологии шизофрении. Исследование семей, в которых есть больные показало следующую статистику: в первой линии родства шизофрения проявляется с частотой примерно 10–12 %, во второй линии родства 3–5 % (The genetics of schizophrenia: a current genetic–epidemiologic perspective. [Электронный ресурс] // NHBI, 2018). Стоит учитывать, что если, например, больны оба родителя – вероятность увеличивается, так же как и в случае с однояйцевыми близнецами (Юрьева Л. Н. и др., 2010).

Также была обнаружена генно–средовая зависимость, подтвержденная экспериментами с усыновленными детьми. В семьях, где дети имели генетическую предрасположенность к шизофрении, процент заболеваемости был выше, чем у других детей. Таким образом, считается, что шизофрения обусловлена взаимодействием нескольких факторов, в данном случае наследственного и влияния среды (The genetics of schizophrenia: a current genetic–epidemiologic perspective. [Электронный ресурс] // NHBI, 2018; Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] // Главная страница/ Центр СМИ / Информационные бюллетени / шизофрения. ВОЗ, 2019. Доступ. URL: https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia, 2018).

1.3 Роль генетики в шизофрении

Давно известно о генетической обусловленности шизофрении, что привело к активному поиску генов, детерминирующих ее развитие. На сегодняшний день число таких генов невелико (Голимбет В. Е., 2008).

Одним из кандидатов является ген катехол–О–метилтрансферазы (*COMT*), фермента, играющего важную роль в распаде катехоламинов, в частности, дофамина, который необходим для функционирования различных мозговых процессов. Считается, что нарушение работы дофаминергической системы путем снижения нейротрансмиссии приводит к когнитивному дефициту при шизофрении. Ассоциаций полиморфизмов *COMT* с шизофренией не обнаружено, однако известно влияние некоторых SNP на развитие когнитивных дисфункций (Bosia M. et al., 2015; Malhotra A. K. et al., 2002). Гены дофаминовых рецепторов (*DRD2, DRD3, DRD4, DRD5*), также участвуют в дисфункции дофаминергической системы, что может приводить к развитию шизофрении (Голимбет В. Е., 2008).

Кроме дофаминовой теории, одной из наиболее популярных является серотониновая гипотеза патогенеза шизофрении. Серотонин играет роль в регуляции морфогенеза ЦНС, участвует в процессах пролиферации, миграции и дифференцировки нейронов. В нарушении работы серотониновой системы могут участвовать рецепторы серотонина, которые являются генами–кандидатами на основании их локализации и функций (Голимбет В. Е., 2008).

Исследование, проводимое в США на белой американской, латиноамериканской и афроамериканской популяциях, в ходе которого обнаружены ассоциации некоторых SNP (P1578, P1763, P1320 и P1765) с шизофренией у белых и латиноамериканцев, свидетельствует о вкладе гена дисбиндина (*DTNBP1*) в развитие данного заболевания (Funke B. et al., 2004).

Причастность *DISC1* (ген дисфункционирующий при шизофрении1) к развитию шизофрении, была доказана экспериментами на модельных

животных. При воспроизведении нарушений функционирования *DISC1* у мышей наблюдались симптомы шизофрении (Yingwei M. et al., 2009; Hikida T. et al., 2007). Кроме того, дисфункция продуктов данного гена, также связана с развитием других психических заболеваний.

1.4 Характеристика киназы гликогенсинтазы 3β (*GSK–3β*) и ассоциации *GSK–3β* с развитием шизофрении

1.4.1 Общая характеристика *GSK–3β*

Киназа гликогенсинтазы 3 (*GSK–3*) относится к подклассу протеинкиназ – группе ферментов, обеспечивающих перенос фосфатной группы от АТФ на субстраты. Впервые *GSK–3* была описана в 1980 году, как фермент, ингибирующий гликогенсинтазу в ответ на действие инсулина (Embi N. et al., 1980). Фермент обнаружен почти во всех тканях большинства эукариотических организмов (Pandey M. K. et al., 2016).

Для млекопитающих характерно наличие нескольких изоформ *GSK 3*: α и β (Pandey M. K. et al., 2016). Структурно они схожи и являются высоко гомологичными (*GSK–3α* на 98 % идентична *GSK–3β*). Изоформа *GSK–3α* имеет большую молекулярную массу (51 KDa), (что обусловлено наличием на N–цепи 63 дополнительных аминокислотных остатка), но на сегодняшний день ее функция не изучена (Woodgett J. R., 1990).

Что касается *GSK–3β*, она представляет собой многофункциональную серин/треонинкиназу, массой 47 KDa, встречается в цитоплазме, ядре (Bijur G .N. et al., 2001; Diehl J. A. et al., 1998), митохондриях, ЭПР, свободных рибосомах (Tang H. et al., 2013). Белок кодируется геном *GSK3β*, локализованным в длинном плече хромосомы 3 на участке 13.33 (NCBI / Gene / GSK3β [Homo sapiens (human)] [Электронный ресурс] // NCBI / Gene. 2018. Доступ. URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2932, 2018). Считается, что этот фермент в клетке всегда находится в активном состоянии, что

обеспечивается фосфорилированием тирозина 216. В свою очередь, фосфорилирование серина в положении 9, наоборот, ингибирует активность *GSK–3β* (Pandey M. K. et al., 2016).

Известно, что большое количество клеточных процессов, контролируемых геном *GSK3*, прямо или косвенно связано с его способностью модифицировать субстраты путем фосфорилирования (в частности – самофосфорилирования) остатка серина или треонина (Gao S. et al., 2014).

Первой открытой функцией *GSK–3β* была регуляция синтеза гликогена. Путем фосфорилирования *GSK–3β* способна ингибировать гликогенсинтазу. Инсулин действует на активность *GSK–3β,* посредством активации протеинкиназы B (Akt 1), которая в свою очередь ингибирует *GSK–3β*, также инсулин способен предотвращать ингибирующее действие гликогенсинтазы киназы–3β на eIF–2, что активирует синтез белка (Rayasam G. et al., 2009).

GSK–3β играет роль в регуляции глюкозы, ингибируя белки IRS–1, IRS–2, IRS–3, IRS–4 (субстраты инсулинового рецептора) и кинезины (обеспечивают перемещение транспортера глюкозы GLUT4 на мембрану клетки) (Morfini G. et al., 2002). Также *GSK–3β* задействован в регуляции Wnt–сигнального пути, который играет важную роль в процессах эмбриогенеза, роста и дифференцировки клеток. Для функционирования Wnt необходим активный β–катенин. В свою очередь, *GSK–3β* в комплексе с белками APC и кизеинкиназой путем фосфорилирования связывает β–катенин, что является причиной его деградации (Doble B. W. et al., 2003). Стоить отметить, что данный процесс обратим при участии белка Dvl (disheveled), способным ингибировать фосфорилирование β–катенина «деградирующим комплексом» (Татарский В. В., 2016).

Обнаружено, что *GSK–3β* способна регулировать клеточный цикл путем ингибирования циклин D1, необходимого клетке для вхождения в S–фазу (Alt J. R. et al., 2000). Также *GSK–3β* фосфорилирует и препятствует деградации транскрипционного фактора Rev–Erα, играющего важную роль в

регуляции циркадных ритмов (Yin L. et al., 2006). Также гликогенсинтаза регулирует образование про– и противовоспалительных цитокинов, что обусловлено ее участием в проведении сигнала от TLR (Toll–like receptor) на моноцитах, приводящим к усилению продукции IL–1β, IFN–γ, IL–6, IL–12 и подавлению синтеза IL–10 (Martin M. et al., 2005).

Кроме того, она регулирует образование амилоидного β–пептида из его предшественника и ингибирует тау–белок, что является одним из механизмов патогенеза болезни Альцгеймера (Salcedo–Tello P. et al., 2011).

GSK–3β участвует в процессах нейродегенерации, синаптической пластичности (основной механизм реализации феномена памяти, обучения и сна), а так же участвует в патогенезе ряда заболеваний, одним из которых является шизофрения.

В тоже время роль *GSK–3β* в развитии данного заболевания остается известной не до конца, так как результаты исследований этой проблемы довольно противоречивы. Тем не менее, некоторые эксперименты свидетельствуют о существенном вкладе *GSK–3β* в патогенез шизофрении.

В результате изучения аутопсийных образцов лобной коры головного мозга обнаружено, что содержание и активность *GSK–3β* у больных шизофренией ниже на 41 %, по сравнению с другими исследованными группами (биполярное расстройство, депрессия) (Kozlovsky N.et al., 2000). Анализ материала дорсолатеральной префронтальной коры и гиппокампа также показал снижение уровня мРНК *GSK–3β* (Nadri C. et al., 2004). Группа ученых во главе с Э. Эмамиан обнаружила низкое содержание и активность *GSK–3β* в лимфоцитах периферической крови пациентов (Emamian E. et al., 2004). Однако С. Надри с коллегами в подобном исследовании не установили значимых различий в содержании и активности *GSK–3β* в лимфоцитах между анализируемыми группами (Nadri C. et al., 2002).

Исследования на животных также доказывают причастность *GSK–3β* к развитию шизофрении. Примером служит эксперимент с использованием неонатального эксайтотоксического повреждения гиппокампа крыс как

модели шизофрении, в результате которого у данных животных было выявлено снижение общего содержания *GSK–3β* без изменения активности (Nadri C. et al., 2003).

1.4.2 Анализ исследований связи полиморфизмов гена *GSK–3β* с шизофренией

Полиморфные варианты генов, ассоциированные с заболеванием, могут обладать измененной функциональной активностью. На сегодняшний день вопрос связи гена *GSK–3β* с шизофренией остается актуальным и довольно спорным, что объясняется разными результатами, полученными в ходе исследований одних и тех же полиморфизмов.

Независимыми группами ученых, в исследованиях с китайской популяцией была найдена связь rs3755557, rs7431209, rs1332098 и rs6771023, rs2199503 с этиологией шизофрении, также Х. Танг с коллегами обнаружили ассоциацию полиморфизма rs334558 с риском развития данного заболевания. В тоже время, Дж. Менг с соавторами не нашли связи *GSK–3β* с шизофренией у китайского населения (Meng J. et al., 2008; Tang H. et al., 2013; Lee. K. Y. et al., 2005; Nadri C. et al., 2003).

Кроме того, ряд исследователей других популяций не обнаружили данной связи, как, например, экспериментальная работа с корейским населением не показала ассоциаций с заболеванием (Lee. K. Y. et al., 2005), так же, как и исследование, проведенное Р. Соуза с коллегами на европеоидной популяции, не выявило связи трех SNP rs7624540, rs4072520, rs6779828 с развитием этой болезни (Souza R. P. et al., 2008).

Таким образом, можно предположить, что ассоциация *GSK–3β* с шизофренией проявляется в разных популяциях с разными полиморфизмами гена. Следовательно, требуются дальнейшие исследования по данному вопросу.

1.5 Характеристика *STEP*(*PTPN5*) тирозинфосфатазы и роль в развитии различных заболеваний

1.5.1 Общая характеристика тирозинфосфатазы

Впервые *STEP* тирозинфосфатаза была выделена из ДНК полосатого тела крысы. Дальнейший анализ всех структур мозга показал большее содержание *STEP* именно в стриатуме, по сравнению с другими структурами, что обусловливает название данного фермента (Lombroso P. S. et al., 1991). Кроме полосатого тела *STEP* тирозинфосфатаза встречается в центральном ядре миндалины, зрительном нерве, коре больших полушарий, гиппокампе, спинном мозге и т.д. (Boulanger L. M. et al., 1995; Lorber B. et al., 2004). Позднее был обнаружен гомолог данного фермента, характерный для человека. Его дальнейшее исследование продемонстрировало высокую степень гомологии (приблизительно 85-90 %) белков на молекулярном уровне. У крыс данный фермент является продуктом одноименного гена *STEP*, локализованного в 7B3-B5 хромосоме, в свою очередь у человека тирозинфосфатаза продуцируется геном *PTPN5*, расположенным в 11p15.2-p15.1 хромосоме (Li X. et al., 1995).

STEP относится к семейству внутриклеточных тирозинфосфатаз – группе ферментов, катализирующих дефосфорилирование субстрата в результате гидролиза сложноэфирной связи фосфорной кислоты. На сегодняшний день известно несколько изоформ данного фермента отличающихся строением, локализацией и выполняемыми функциями (Goebel-Goody S. M. et al., 2012).

Основными являются цитозольный *STEP46* и ассоциированный с мембранной *STEP61*, однако существуют и другие формы. И *STEP61*, и *STEP46* содержат консервативный каталитический домен PTP на C-конце, KIM домен, необходимый для взаимодействия со всеми субстратами, идентифицированными на сегодняшний день. *STEP46* состоит из 369

аминокислотных остатков, в свою очередь *STEP61* имеет дополнительные 172 аминокислотных остатка на N-конце, которые включают богатые полипролином домены (PP) и трансмембранные домены (TM). Домен PP обеспечивает взаимодействие *STEP 61* с Fyn и Pyk2, что указывает на то, что эти домены (в дополнение к домену KIM) вносят вклад в субстратную специфичность *STEP61* (Karasawa T. et al., 2014).

Тирозинфосфатаза представляет собой большой интерес, так как обеспечивает преобразование ключевых молекул, необходимых для осуществления функционирования нейронов, в том числе и процесса синаптической пластичности. Например, в возбуждающих нейронах действие данного фермента направленно на постсинаптическую мембрану, где одной из функции является регуляция эндоцитоза NMDAR непосредственно путем дефосфорилирования GluN2B Tyr^{1472} и косвенно дефосфорилированием и инактивацией Fyn (Goebel-Goody S.M. et al., 2009; Nguyen T. et al., 2002).

Возрастание содержания *STEP* в клетках височной доли гиппокампа приводит к инактивации ERK1/2, вследствие чего происходит гибель ГАМКергических нейронов, что является одним из механизмов возникновения эпилепсии (Choi Y. et al., 2007). Интересно, что дисфункция *STEP* приводит к снижению возбудимости нейронов зубчатой извилины гиппокампа и наоборот повышает возбудимость пирамидных нейронов. Полученные данные свидетельствуют о возможном использовании ингибиторов данной тирозинфосфатазы для обеспечения резистентности к эпилепсическим припадкам. Таким образом, изменяющийся баланс *STEP* в клетках может оказывать влияние на гомеостаз нейронов (Aaron G. et al., 2011).

Химическая активность *STEP* заключается в способности связывать и дефосфорилировать субстраты, что регулируется несколькими процессами, в том числе фосфорилированием, протеолизом и димеризацией. В свою очередь, нарушения которых, влияют на дисфункцию тирозинфосфатазы. Известно, что повышенная активность фермента *STEP* может стать

причиной, например, болезни Альцгеймера, шизофрении, синдрома ломкой Х–хромосомы. С другой стороны, пониженная активность данного белка также может приводить к болезни Гентингтона, инсульту и прочим болезням (Goebel-Goody S. M. et al., 2012).

Таким образом, *STEP* регулирует деятельность нейронов и, кроме того, дисбаланс *STEP* является основой патологических молекулярных процессов, служащих причиной возникновения заболеваний, что свидетельствует о возможности использования фосфатазы в качестве молекулярной мишени для разработки терапевтических стратегий.

1.5.2 Участие *STEP* в патогенезе различных психических расстройств

Повышенное содержание амилоид-бета-пептида приводит к гиперактивности *STEP*, вследствие чего наблюдается нарушение когнитивных способностей. Существуют два пути, обеспечивающих повышение активности тирозинфосфатазы:

1. Дефосфорилирование *STEP* на Ser ^{221} посредством Aβ-индуцированной активации PP2B и PP1 (Snyder E. M. et al., 2005).
2. Снижение деградации *STEP* путем инактивации UPS амилоид-бета-пептидом (Kurup P. et al., 2010).

Данные химические механизмы причастны к развитию болезни Альцгеймера, что было продемонстрированно на клетках мозга лабораторных мышей и человека в ряде исследований (Karasawa T. et al., 2014).

Кроме того, описана роль тирозинфофатазы в патогенезе синдрома хрупкой Х-хромосомы. У мышей, нокаутных по гену *FMR1*, наблюдается гиперфункция *STEP*, провоцирующая возникновение припадков, социально-аномальных поведенческих реакций. На молекулярном уровне происходит взаимодействие между FMRP белком – продуктом данного гена и тирозинфосфатазой. Интересно, что в экспериментах на мышах при

ингибировании *STEP* наблюдалось снижение припадков и нормализация поведения животных (Goebel-Goody S. M. et al., 2012).

Важным фактом является причастность тирозинфосфатазы к возникновению моторных расстройств поведения при болезни Паркинсона, что было продемонстрировано на лабораторных мышах. Кроме того, на клеточном уровне наблюдается дисфункция синапсов, подтвержденная экспериментально на культурах мозговых клеток человека и мышей. Дело в том, что мутации в гене *PARK2* приводят к синтезу фермента parkin, неспособного регулировать уровень содержания активного *STEP*, что становится причиной его накопления в клетках. В обычных условиях исходная функция parkin сводится к поддержанию нормы баланса тирозинфосфатазы убиквитинированием, обеспечивающим деградацию *STEP* (Kurup P. K. et al., 2015).

Однако дефицит тирозинфосфатазы в нервных клетках также может спровоцировать возникновение симптомов некоторых заболеваний, как например при болезни Гентингтона. В данном случае нейроны становятся подвержены клеточной гибели, при этом основой патогенеза является массовое поражение клеток (Saavedra A. et al., 2011).

Кроме того, *STEP* рассматривают как терапевтическую мишень для лечения пациентов перенесших инсульт. Дело в том, что после инсульта происходит снижение уровня тирозинфосфатазы, вследствие чего в дальнейшем *STEP61* деградирует и переходит в другую форму *STEP33*, которая инициирует гибель клеток по p38 пути. Известно, что предотвращение дальнейшего распада *STEP61* может помочь в терапии пациентов (Xu J. et al., 2009).

1.5.3 Роль тирозинфосфатазы в патогенезе шизофрении

На сегодняшний день одной из самых популярных является глутаматергическая гипотеза патогенеза шизофрении. Предполагается, что

гипофункция NMDAR, представляет собой один из механизмов, провоцирующих симптомы болезни (Donald C. et al., 2001).

Данный факт подтверждается анатомическими исследованиями, проведенными на срезах мозга больных, которые показали снижение экспрессии ионотропных рецепторов глутамата в префронтальной коре, таламусе и височной доле по сравнению с контролем (Gao X. M. et al., 2000; Ibrahim H. M. et al., 2000). Более того, мыши с подобными молекулярными нарушениями демонстрировали симптоматику шизофрении (Belforte J. E. et al., 2010).

Одним из возможных объяснений нарушения функционирования NMDAR является дисбаланс активного *STEP*. Обнаружено, что в клетках срезов поясной извилины головного мозга больных уровни тирозинфосфатазы значительно выше, чем в контрольных образцах. Кроме того, при введении мышам антагонистов NMDAR, провоцирующих проявление шизофренически-подобных симптомов, в клетках мозга мышей наблюдалось повышенное содержание *STEP61*. Также известно, что при введении некоторых нейролептиков мышам происходит инактивация *STEP*, запускающая фосфорилирование различных субстратов данного фермента, в том числе и субъединицы NMDA-рецептора – GluN2B (Goebel-Goody S. M. et al., 2012; Xu J. et al., 2016).

Таким образом, гиперактивный *STEP* ингибирует синаптическую экспрессию GluN2B-содержащих NMDAR с помощью двух механизмов:

1. Дефосфорилирования GluN2B Tyr^{1472};
2. Дефосфорилирования и инактивации Fyn по Tyr^{420}, данная киназа фосфорилирует GluN2B по Tyr^{1472} (Carty N. C. et al., 2012).

В настоящий момент актуальным является поиск ингибиторов *STEP*, так как он выступает в качестве терапевтической мишени при лечении шизофрении.

Кроме того, активно ведутся поиски ассоциаций различных вариантов гена *PTPN5* с шизофренией, так как последние могут обладать измененными

функциями, приводящими впоследствии к развитию болезни. Группой ученых в Израиле при анализе еврейской популяции была обнаружена связь rs4075664 с шизофренией. Два дополнительных SNP, rs2278732 и rs4757710, показали тенденцию к ассоциации с заболеванием (p = 0,07). Дальнейшее исследование внутри групп, разделенных по гендерному признаку выявило у мужчин связь 3 SNP (rs4075664, rs2278732, rs4757710) с шизофренией, и напротив, у женщин не обнаружено ассоциации с двумя последними вариантами. Предполагается, таким образом, возможный гендерно-специфический эффект, проявляемый геном *PTPN5* при шизофрении (Pelov I. et al., 2012).

Стоит упомянуть, что вопрос поиска как ингибиторов *STEP*, так и ассоциаций с заболеванием остается открытым и требует дальнейшего исследования.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

Исследование проводили в соответствии с требованиями Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов (2000 г). Отбор пациентов для исследований и сбор биологического материала в последующем осуществляли на основе добровольного и информированного согласия. Обследованная выборка содержала 470 пациентов, этнических русских, из них 236 женщин и 234 мужчины, средний возраст индивидов составлял 42,1±1,4 (от 18 до 77 лет включительно) с верифицированным диагнозом параноидной шизофрении в соответствии с диагностическими критериями МКБ–10. Отбор пациентов проводили на основе нескольких психиатрических отделений: ОГБУЗ «Томская клиническая психиатрическая больница», ГКУЗ «Кемеровская областная клиническая психиатрическая больница» и ГКУЗ «Краевая клиническая психиатрическая больница имени В. Х. Кандинского». Контрольная группа численностью 221 человек по возрасту и численному соотношению индивидов разного пола от выборки пациентов не отличалась.

В качестве материала для исследования использована венозная кровь, которую отбирали из локтевой вены натощак, в период с 8.00 до 9.00 в пробирки фирмы BD Vacutainer с антикоагулянтом ЭДТА и далее использовали для выделения ДНК.

2.2 Методы исследования

ДНК выделяли стандартным методом фенол–хлороформной экстракции из лейкоцитов периферической крови индивидов. Обязательным условием

являлась предварительная заморозка крови. Принцип этого метода заключается в разделении фаз раствора ДНК и фенол–хлороформной смеси. В качестве лизирующего раствора использовался SLR.

Состав растворов:

I. SLR

10 мл 2M TRIS (pH 7,6)

10 мл 1M MgCl2

6,6 мл 3M NaCl

II. SLB

10 мл 2M TRIS (pH 7,6)

50 мл 0.4M EDTA (ph 8)

34 мл 3M NaCl

Ход работы:

1. Размороженную кровь аккуратно перемешать.

2. 0,5 мл крови перенести в эппендорф на 1,5 мл и добавить 0,5 мл SLR. Перемешать на вортексе, центрифугировать при 40 °C 6 минут при 10000 об/мин, после чего осторожно слить супернатант.

3. Добавить 1 мл (до верха эппендорфа) SLR. Осадок разбить на вортексе. Центрифугировать 3 мин при 5000 об/мин при 40 °C.

4. Слить супернатант и последнюю каплю снять фильтровальной бумагой.

5. Повторить пункты 4–5 пока осадок не приобретёт белый или бледно–розовый цвет (для относительно свежей крови), или грязно–красный цвет (для крови, подвергшейся длительному хранению). Три раза по 3 мин при 5000 об/мин.

6. К осадку добавить 400 мкл SLB, тщательно разбить. Добавить по 40 мкл 10 % SDS и 8 мкл протеиназы К. Аккуратно перемешать, переворачивая пробирку.

7. Инкубировать 3 часа при 56 °С. Для лучшего растворения время инкубации можно увеличит до 5 часов.

8. После инкубации пробирки остудить и внести в них по 200 мкл 6М NaCl и 500 мкл фенол/хлороформ/изоамиловый спирт смеси (25/24/1) и перемешивать в течение 8–10 мин. Это приводит к отделению ДНК от белков.

9. Центрифугировать 15 мин при 10000 об/мин. В результате образуется интерфаза, состоящая из белков.

10. Переместить водную фазу – раствор, содержащий ДНК – в чистый эппендорф.

11. К супернатанту в чистом эппендорфе добавить 0,5 мл охлажденного 96% спирта и центрифугировать 5 мин при 10000 об/мин.

12. Вращательными движениями накручиваем ДНК саму на себя.

13. Центрифугировать (чтобы ДНК осела на дно эппендорфа), спирт слить.

14. К осадку ДНК добавить 1 мл 70 % спирта, перемешать и центрифугировать 30 сек. при 12000 об/мин.

15. Слить спирт, последнюю каплю снять фильтровальной бумагой, подсушить ДНК на воздухе 5–10 мин (до исчезновения запаха спирта).

16. Добавить 50 мкл H_2O и оставить на ночь при комнатной температуре для полного растворения ДНК.

Полученные образцы хранятся в морозильной камере при t = –20 °С. Из них готовится рабочий раствор ДНК с концентрацией 50–100 нг/мкл.

Генотипирование проводили на базе лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ Психического Здоровья Томского НИМЦ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени. Данный метод основан на использовании флуорофоров – молекул, обладающих способностью к флуоресценции в результате поглощения энергии света с определенной длиной волны и её излучению в виде света с другой длиной волны. Использование специальных флуоресцентных меток позволяет

отказаться от стадии электрофореза, что ведет к резкому уменьшению вероятности контаминации исследуемых проб продуктами амплификации. Real-time PCR позволяет производить измерения накопления продукта непосредственно в ходе реакции и детектировать генотипы более точно.

Для исследования были выбраны полиморфизмы rs334558 гена *GSK–3β* и rs4075664 гена *PTPN5*. При проведении полимеразной цепной реакции использовали амплификатор QuantStudio5 и коммерческие праймеры.

2.3 Статистическая обработка результатов

Соотношение частот полиморфных вариантов генов *GSK–3β* и *PTPN5* проверяли на соответствие равновесию Харди – Вайнберга с помощью критерия χ^2. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Также рассчитывалось отношение шансов (OR, odds ratio) с указанием 95 % доверительного интервала. Анализ результатов проводили в программном пакете IBM SPSS Statistics 22.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа одиночного полиморфизма rs334558 гена *GSK–3β* не выявлено статистически значимых различий между группой пациентов и контрольной группой (χ^2 = 1,919; p = 0,383) (Таблица 1). В исследованной выборке генетический маркер rs334558 не показал ассоциаций с шизофренией (p > 0,05). Однако анализ данных литературы свидетельствует о связи варианта с данным заболеванием: группой ученных во главе с Хуэй Танг была найдена ассоциация rs334558 в китайской популяции.

Таблица 1 – Абсолютные числа и частоты (%) генотипов и аллелей полиморфного варианта rs334558 гена GSK–3β в группе лиц, страдающих шизофренией, и контроле

Генотипы и аллели	Пациенты	Контроль	χ^2	p	OR	
					Значение	95 % Cl
AA	146 (31,53)	32 (25,20)	1,919	0,383	1,37	0,88–2,14
AG	228 (49,24)	69 (54,33)			0,82	0,55–1,21
GG	89 (19,22)	26 (20,47)			0,92	0,57–1,51
A	520 (56,16)	133 (52,36)	1,160	0,280	1,17	0,88–1,54
G	406 (43,84)	121 (47,64)			0,86	0,65–1,13
Примечания: p – уровень значимости; OR(odds ratio) – отношение шансов; 95 % Cl – 95 % доверительный интервал						

Различий по частоте регистрации анализируемого признака между группами не обнаружено, таким образом сделать вывод о статистической значимости данных генотипов и аллелей невозможно (Таблица 1). Вычисление статистики отношения шансов и доверительного интервала для генотипов и аллелей также не выявило статистически значимых результатов,

вследствие чего нельзя сделать заключения ни о протективном, ни о предиспонирующем эффектах.

Дальнейший анализ внутри группы пациентов не показал ассоциаций аллелей и генотипов гена *PTNP5* как с позитивной, так и с негативной симптоматикой. Полученные значения отношения шансов и доверительного интервала не позволяют сделать вывод ни о предиспонирующем, ни о протективном эффектах (Таблица 2).

Таблица 2 – Абсолютные числа и частоты (%) генотипов и аллелей полиморфного варианта rs334558 гена *GSK–3β* в группах пациентов с позитивной и негативной симптоматикой

Генотипы и аллели	Пациенты с позитивной симптоматикой	Пациенты с негативной симптоматикой	χ^2	p	OR	
					Значение	95 % Cl
AA	74 (31,10)	54 (30,20)	1,989	0,370	1,04	0,69–1,59
AG	111 (46,60)	94 (52,50)			0,79	0,54–1,17
GG	53 (22,30)	31 (17,30)			1,37	0,84–2,24
A	259 (54,41)	202 (56,42)	0,330	0,560	0,92	0,70–1,21
G	217 (45,59)	156 (43,58)			1,08	0,82–1,43
Примечания: p – уровень значимости; OR(odds ratio) – отношение шансов; 95 % Cl – 95 % доверительный интервал						

В результате анализа одиночного полиморфизма rs4075664 гена *PTPN5* обнаружены статистически значимые различия между группой пациентов и контрольной группой ($\chi2$ = 6,00, p = 0,05) (Таблица 3). В исследуемой выборке генетический маркер rs4075664 показал ассоциацию с шизофренией (p = 0,05).

Кроме того, работы зарубежных исследователей, так же свидетельствуют об ассоциации варианта с шизофренией. Так, например, группой ученых в

Израиле при анализе еврейской популяции была обнаружена связь rs4075664 с шизофренией.

Таблица 3 – Абсолютные числа и частоты (%) генотипов и аллелей полиморфного варианта rs4075664 гена *PTPN5* в группах лиц, страдающих шизофренией, и контроля

Генотипы	Пациенты	Контроль	χ^2	p	OR	
					Значение	95 % Cl
CC	80 (28,40)	47 (22,30)	6,01	0,05	1,38	0,91–2,09
CT	148 (52,50)	105 (49,80)			0,11	0,78–1,59
TT	54 (19,10)	59 (28,00)			0,61	0,40–0,93
C	308 (54,61)	199 (47,16)	5,37	0,02	1,35	1,05–1,74
T	256 (45,39)	223 (52,84)			0,74	0,58–0,96
Примечания: p – уровень значимости; OR(odds ratio) – отношение шансов; 95 % Cl – 95 % доверительный интервал						

Вычисление статистики отношения шансов (OR) и доверительного интервала для генотипов и аллелей показало, что генотип TT встречается реже у больных, чем в контроле, что может свидетельствовать о протективном свойстве данного генотипа: шанс заболеть для обладателей этого признака ниже (Таблица 3).

Аллель C статистически чаще встречается у больных, чем в контроле, что может свидетельствовать о предиспонирующем эффекте. В свою очередь, аллель T статистически реже встречается у больных, чем в контроле, что может рассматриваться как протективный эффект (Таблица 3).

Дальнейший статистический анализ внутри группы пациентов и полученные значения OR и 95 % доверительного интервала не показали ассоциации определенного генотипа или аллеля с позитивной и негативной

симптоматикой, что не позволяет сделать заключение ни о предиспонирующем, ни о проттективном эффектах (Таблица 4).

Таблица 4 – Абсолютные числа и частоты (%) генотипов и аллелей полиморфного варианта rs4075664 гена *PTPN5* в группах пациентов с позитивной и негативной симптоматикой

Генотипы и аллели	Пациенты с позитивной симптоматикой	Пациенты с негативной симптоматикой	χ^2	p	OR	
					Значение	95 % Cl
CC	40 (29,60)	32 (28,30)	0,763	0,683	1,07	0,61–1,85
CT	70 (51,90)	55 (48,70)			1,14	0,69–1,87
TT	25 (18,50)	26 (23,00)			0,76	0,41–1,41
C	150 (55,56)	119 (52,65)	0,420	0,520	1,12	0,79–1,60
T	120 (44,44)	107 (47,35)			0,89	0,62–1,27
Примечания: p – уровень значимости; OR(odds ratio) – отношение шансов; 95% Cl – 95% доверительный интервал						

Таблица 5 – Ожидаемые и наблюдаемые частоты генотипов rs334558 гена *GSK–3β* в группах пациентов и контроля

Полиморфный вариант гена GSK–3β	Группы	Генотипы			χ^2	p
		AA	AG	GG		
rs334558	Случаи (наблюдаемые)	0,315	0,492	0,192	0,01	0,98
	Случаи (ожидаемые)	0,315	0,492	0,192		
	Контроль (наблюдаемые)	0,252	0,543	0,205	1,01	0,32
	Контроль (ожидаемые)	0,274	0,499	0,227		

Таблица 6 – Ожидаемые и наблюдаемые частоты генотипов rs4075664 гена *PTPN5* в группах пациентов и контроля

Полиморфный вариант гена PTPN5	Группы	Генотипы			χ^2	p
		CC	CT	TT		
rs4075664	Случаи (наблюдаемые)	0,284	0,525	0,191	0,97	0,32
	Случаи (ожидаемые)	0,298	0,496	0,206		
	Контроль (наблюдаемые)	0,223	0,498	0,280	0,01	0,98
	Контроль (ожидаемые)	0,222	0,498	0,279		

Сравнение наблюдаемых и ожидаемых частот и полученные значения χ2 соответствуют распределению по закону Харди – Вайнберга (Таблица 5, 6).

Таким образом, результаты полученные в ходе данного исследования сопоставимы с результатами, полученными зарубежными ученными. Как, например, найденная израильскими исследователями связь rs4075664 гена *PTPN5* с шизофренией в еврейской популяции. Или как исследование, проводимое группой ученых во главе с Джунвей Менг, в результате которого ассоциации rs334558 гена *GSK–3β* в китайской популяции не обнаружено.

Однако также есть работы, с противоположными заключениями, например, исследование, проведенное на китайской популяции Хуэй Танг с командой, в ходе которого была обнаружена связь rs334558 с шизофренией.

Неоднозначность полученных результатов может объясняться множеством причин, как пример, разными экспериментальными и статистическими подходами. Стоит упомянуть, что шизофрения является полифакторным заболеванием, поэтому сказать однозначно является ли дисфункция генов *GSK–3β* или *PTNP5* причиной возникновения шизофрении в той или иной популяции невозможно. Кроме того, исследования, посвященные изучению связи генов *GSK–3β* и *PTNP5* с патогенезом шизофренией немногочисленны.

В настоящий момент вопрос ассоциации *GSK–3β* и *PTNP5* с шизофренией и другими психическими заболеваниями остается актуальным и требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Ассоциаций полиморфного варианта rs334558 гена *GSK–3β* с развитием шизофрении не выявлено;
2. Связи определенного генотипа и аллеля гена *GSK–3β* с симптоматикой у пациентов с параноидной шизофренией не установлено;
3. Обнаружена ассоциация полиморфного варианта rs4075664 гена *PTPN5* с развитием шизофрении в группе пациентов, значения отношения шансов и доверительного интервала свидетельствуют о протективном эффекте генотипа TT и аллеля T, и о предиспонирующем эффекте аллеля C;
4. Связи определенного генотипа и аллеля гена *PTPN5* с симптоматикой у пациентов с параноидной шизофренией не установлено.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ассоциация (N251S)–PIP5K2A с расстройствами шизофренического спектра: исследование русской популяции Сибири / О. Ю. Федоренко [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2013. – №5. – С. 58–61.
2. Валентик Ю. В. Особенности зависимости от психоактивных веществ у больных шизофренией / Ю. В. Валентик, Е. Э. Калинкина, Э. С. Дроздов // Наркология. – 2002. – № 4. – С. 27–33.
3. Гаррабе Ж. История шизофрении / Ж. Гаррабе. – СПб. : Москва, 2000. – 141 с.
4. Голимбет В. Е. Молекулярно–генетические исследования познавательных нарушений при шизофрении // Молекулярная биология. – 2008. – №5. – С. 83–89.
5. Жмуров В. А. Большая энциклопедия по психиатрии / В. А. Жмуров. – 2–е изд. – М. : Джангар, 2012. – 864 с.
6. Иванова С. А. Роль киназы гликогенсинтазы–3β в патогенезе психических расстройств / А. С. Иванова, И. С. Лосенков, Н. А. Бохан // Журнал неврологии и психиатрии. – 2014. – №6. – С. 93–100.
7. Информационный бюллетень: Шизофрения [Электронный ресурс] // Всемирная Организация Здравоохранения – Апрель 2018 г. – URL: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs397/ru/ (дата обращения 23.05.2018).
8. Крук И. В. Толковый словарь психиатрических терминов / И. В. Крук, И. М. Блейхер. – Воронеж : НПО «Модэк», 1995. – 221 с.
9. Нестерович А. Н. Нейроанатомические и нейрофизиологические корреляты психопатологических дименсий шизофрении / А. Н. Нестерович, В. Г. Объедков // Медицинские новости. – 2015. – № 1. – С. 10–14.

10. Полянский Д. А. Вопросы иммунологии при шизофрении и вич–инфекции / Д. А. Полянский, В. В. Калинин // СОЦИАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ПСИХИАТРИЯ. – 2015. – Т.25. – № 4. – С. 86–91.
11. Снежевский А. В. Психиатрия: руководство для врачей : в 2 т. / А. В. Снежневский, Д. Д. Орловская; под ред. А. С. Тиганова. – М. : ОАО «Издательство медицина», 2012. – Т. 1. – 218 с.
12. Снежевский А. В. Психиатрия: руководство для врачей : в 2 т. / А. В. Снежневский, Д. Д. Орловская; под ред. А. С. Тиганова. – М. : ОАО «Издательство медицина», 2012. – Т. 2. – 222 с.
13. Татарский В. В. Сигнальный путь Wnt: перспективы фармакологического регулирования // Успехи молекулярной онкологии. – 2016. – №3. – С. 28–31.
14. Узлов Н. Д. Шизофрения как клинический и культурный феномен: к проблеме шизофренизации массового сознания: монография / Н. Д. Узлов. – Пермь – 2009. – 369 с.
15. Шизофрения (F20) [Электронный ресурс] // МКБ 10 – Международная классификация болезней 10–го пересмотра. Версия: 2018. – URL: a20 (дата обращения 23.05.2018)
16. Юрьева Л. Н. Этиология и патогенез шизофрении: Лекция // Вестник психиатрии и психологии Чувашии. – 2010. – № 6. – С. 139–153.
17. A Functional Polymorphism in the COMT Gene and Performance on a Test of Prefrontal Cognition / A. K. Malhotra [et al.] // The American journal of psychiatry. – 2002. – Vol. 159. – №4. – P. 652–654.
18. Alt J. R. Phosphorylation–dependent regulation of cyclin d1 nuclear export and cyclin d1–dependent cellular transformation / J. R. Alt [et al.] // Genes & Development Journal. – 2000. – Vol. 14. – №24. – P. 2–14.
19. Association of the DTNBP1 Locus with Schizophrenia in a U.S. Population / B. Funke [et al.] // American Journal of Human Genetics. – 2004. – Vol. 75. – №5. – P. 891–898.

20. Association study of GSK3 gene polymorphisms with schizophrenia and clozapine response / R.P. Souza [et al.] // Psychopharmacology. – 2008. – Vol. 200. – №2. – P. 177–186.
21. Aβ–mediated NMDA receptor endocytosis in Alzheimer's disease involves ubiquitination of the tyrosine phosphatase STEP61 / P. Kurup [et al.] // Journal of Neuroscience. – 2010. – Vol. 30(17). – P. 5948–5957.
22. Bhugra D. The Global Prevalence of Schizophrenia // PLoS Med. – 2005. – №2. – P. 43–54.
23. Bijur G. N. Proapoptotic Stimuli Induce Nuclear Accumulation of Glycogen Synthase Kinase–3β / G. N. Bijur, R. S. Jope // Journal of Biological Chemistry. –2001. – Vol. 276. – №40. – P. 336–342.
24. Bolkan S. Using human brain imaging studies as a guide towards animal models of schizophrenia / S. Bolkan, D. F. Carvalho, C. Kellendonk // Neuroscience. – 2016. – №321. – P. 77–98.
25. Cellular and molecular characterization of a brain-enriched protein tyrosine phosphatase / L. M. Boulanger [et al.] // Neuroscience. – 1995. – Vol. 15. – P. 32–34.
26. COMT and STH polymorphisms interaction on cognition in schizophrenia / M. Bosia [et al.] // Neurological Sciences. – 2015. – №2. – P. 83–89.
27. Detection and management of comorbidity in patients with schizophrenia / A. I. Green [et al.] // Psychiatric Clinics of North America. – 2003. – №26. – P. 115–139.
28. Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3β/β–Catenin Signaling / M. Yingwei [et al.] // Cell. – 2009. – Vol. 136. – №6. – P. 117–131.
29. Disruption of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) function in neuropsychiatric disorders / T. Karasawa, P. J. Lombroso // Neuroscience Research. – 2014. – Vol. 89. – P. 1–9.

30. Doble B. W. GSK–3: tricks of the trade for a multi–tasking kinase / B. W. Doble, J. R. Woodgett // Journal of Cell Science. – 2003. – №113. – P. 74–86.
31. Emamian E. Convergent evidence for impaired AKT1–GSK3β signaling in schizophrenia / E. Emamian [et al.] // Nature Genetics. – 2004. – №36. – P. 131–137.
32. Embi N. Glycogen synthase kinase–3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic–AMP–dependent protein kinase and phosphorylase kinase / N. Embi, D. B. Rylatt, P. Cohen // European Journal of Biochemistry. – 1980. – Vol. 107. – №2 – P. 519–527.
33. Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP / J. Xu [et al.] // Journal of Neuroscience. – 2009. – Vol. 29. – P 30–43.
34. Genetic manipulation of STEP reverses behavioral abnormalities in a fragile X syndrome mouse model / S. M. Goebel-Goody [et al.] // Genes brain and behavior. – 2012. – Vol. 11(5). – P. 586–600.
35. Glycogen synthase kinase (GSK)–3β levels and activity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia / C. Nadri [et al.] // Developmental Brain Research. – 2003. – Vol. 141. – №1. – P. 33 –37.
36. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates kinesin light chains and negatively regulates kinesin–based motility / G. Morfini [et al.] // The EMBO Journal. – 2002. – №21. – P. 281–293.
37. Glycogen synthase kinase–3β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization / J. A. Diehl [et al.] // Genes & Development. – 1998. –Vol. 12. – №22. – P. 345–351.
38. GSK–3 parameters in lymphocytes of schizophrenic patients / C. Nadri [et al.] // Psychiatry Research. – 2002. – №112. – P. 5–7.
39. GSK3β glycogen synthase kinase 3 beta [Homo sapiens (human)] [Электронный ресурс] // NCBI : Gene. – Электрон. дан. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2932 (дата обращения 19.06.2019).

40. GSK–3β Polymorphism Discriminates Bipolar Disorder and Schizophrenia: A Systematic Meta–Analysis / H. Tang [et al.] // Molecular Neurobiology. – 2013. – Vol. 48. – №3. – P. 404–411.
41. Hikida T. Dominant–negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia–associated phenotypes detected by measures translatable to humans / T. Hikida, H. Jaaro–Peled, S. Seshadri // PNAS. – 2007. – Vol. 104. – №36. – P. 141–146.
42. Inhibition of the tyrosine phosphatase STEP61 restores BDNF expression and reverses motor and cognitive deficits in phencyclidine-treated mice / J. Xu [et al.] // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2016. – Vol. 73(7). – P. 1503–1514.
43. Involvement of PTPN5, the gene encoding the STriatal-Enriched protein tyrosine Phosphatase (STEP), in schizophrenia and cognition / I. Pelov [et al.] // Psychiatric genetics. – 2012. – Vol. 22(4). – P.168–176.
44. Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia / H. M Ibrahim [et al.] // Psychiatry. – 2000. – Vol. 157(11). – P. 1811–1823.
45. Ionotropic glutamate receptors and expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in subregions of human hippocampus: effects of schizophrenia / X. M. Gao [et al.] // Psychiatry. – 2000. – Vol. 157(7). – P. 1141–1149.
46. Karasawa T. Striatal– enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) is a brain– specific tyrosine phosphatase that plays a major role in the development of synaptic plasticity / T. Karasawa, P. J. Lombroso // Neuroscience Research. – 2014. – Vol. 89. – P. 1–9.
47. Kozlovsky N. Low GSK–3β Immunoreactivity in Postmortem Frontal Cortex of Schizophrenic Patients / N. Kozlovsky, R. H. Belmaker, G. Agam // The American journal of psychiatry. – 2000. – Vol. 157. – №5. – P. 831–833.

48. Kozlovsky N. Low GSK–3β in schizophrenia as a consequence of neurodevelopmental insult / N. Kozlovsky, C. Nadri, G. Agam // European Neuropsychopharmacology. – 2005. – Vol. 15. – №1. – P. 1–11.
49. Molecular characterization of a protein-tyrosine-phosphatase enriched in striatum / P. J. Lombroso [et al.] // Neurobiology. – 1991. – Vol. 88. – P. 7242–7246.
50. Molecular Cloning of the Human Homolog of a Striatum-Enriched Phosphatase (STEP) Gene and Chromosomal Mapping of the Human and Murine Loci / X. Li [et al.] // Genomics. – 1995. – Vol. 28. – P. 442–449.
51. Nadri C. GSK–3 parameters in postmortem frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients // Schizophrenia Research. – 2004. – Vol. 71. – №2. – P. 377–382.
52. No association of two common SNPs at position –1727 A/T, –50 C/T of GSK–3 beta polymorphisms with schizophrenia and bipolar disorder of Korean population / K. Y. Lee [et al.] // Neuroscience Letters. – 2005. – Vol. 395. – №2. – P. 175–178.
53. No significant association between the genetic polymorphisms in the GSK–3β gene and schizophrenia in the Chinese population / J. Meng [et al.] // Journal of Psychiatric Research. – 2008. – Vol. 42. – №5. – P. 365–370.
54. Nuclear receptor Rev–erbalpha is a critical lithium–sensitive component of the circadian clock / L. Yin [et al.] // Science. – 2006. – Vol. 17. – №311. – P. 57–63.
55. Owen M. J. Schizophrenia / M. J. Owen, A. Sawa, P. B. Mortensen // Lancet. – 2016. – №388. – P. 86–97.
56. Pandey M. K. Glycogen Synthase Kinase–3 (GSK–3)–Targeted Therapy and Imaging / M. K. Pandey, T. R. DeGrado // Theranostics. – 2016. – Vol. 6. – №4. – P. 571–593.

57. Phospho-regulation of synaptic and extrasynaptic *N*-methyl-d-aspartate receptors in adult hippocampal slices / S.M. Goebel-Goody [et al.] // Neuroscience. – 2009. – Vol. 158. – P. 1446–1459.
58. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes / J. E. Belforte [et al.] // Nature Neuroscience. – 2010. – Vol. 13(1). – P. 76–83.
59. Rayasam G. Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake / G.Rayasam [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2009. – Vol. 156. – №5. – P. 85–98.
60. Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-β / E. M. Snyder [et al.] // Nature Neuroscience. – 2005. – Vol. 8. – P. 1051–1058.
61. Research report. Glycogen synthase kinase (GSK)–3 b levels and activity in aneurodevelopmental rat model of schizophrenia / C. Nadri [et al.] // Developmental Brain Research. – 2003. – №141. – P. 33–37.
62. Salcedo–Tello P. GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration // P. Salcedo–Tello, A. Ortiz–Matamoros, C. Arias / International Journal of Alzheimer's Disease. – 2011. – Vol. 11. – №4. – P. 1–12.
63. Status Epilepticus-Induced Somatostatinergic Hilar Interneuron Degeneration Is Regulated by Striatal Enriched Protein Tyrosine Phosphatase / Y. Choi [et al.] // Journal of Neuroscience. – 2007. – Vol. 27. – P. 2999–3009.
64. STEP Regulation of Seizure Thresholds in the Hippocampus / G. Aaron [et al.] // Epilepsia. – 2011. – Vol. 52(3). – P. 497–506.
65. $STEP_{61}$ is a substrate of the E3 ligase parkin and is upregulated in Parkinson's disease / P. K. Kurup [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Vol. 112(4). – P. 1202–1207.
66. Stimulated regeneration of the crushed adult rat optic nerve correlates with attenuated expression of the protein tyrosine phosphatases RPTPα,

STEP, and LAR / B. Lorber [et al.] // Molecular and Cellular Neuroscience. – 2004. – Vol. 4. – P. 404–416.

67. Striatal Enriched Phosphatase 61 Dephosphorylates Fyn at Phosphotyrosine 420 / T. Nguyen, J. Liu, P. J. Lombroso // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – Vol. 227. – P. 24274–24279.

68. Striatal-enriched protein tyrosine phosphatase expression and activity in Huntington's disease: a STEP in the resistance to excitotoxicity / A. Saavedra [et al.] // Journal of Neuroscience. – 2011. – Vol. 31(22). – P. 50–62.

69. The Emerging Role of Glutamate in the Pathophysiology and Treatment of Schizophrenia / C. Donald [et al.] // Psychiatry. – 2001. – Vol. 158(9). – P. 1367–1377.

70. The genetics of schizophrenia: a current, genetic–epidemiologic perspective. [Электронный ресурс]. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8322035 (дата обращения 19.06.2019)

71. The role of genes, stress and dopamine in the development of schizophrenia / O. Howes [et al.] // Biological Psychiatry. – 2016. – № 81. – P. 9–20.

72. The Role of Glycogen Synthase Kinase 3–β in Immunity and Cell Cycle: Implications in Esophageal Cancer / S. Gao [et al.] // Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis. – 2014. – Vol. 62. – №2. – P. 131–144.

73. The tyrosine phosphatase STEP: implications in schizophrenia and the molecular mechanism underlying antipsychotic medications / N. C. Carty [et al.] // Translational Psychiatry. – 2012. – Vol. 2(7). – P. 76–83.

74. Therapeutic Implications for Striatal-Enriched Protein Tyrosine Phosphatase (STEP) in Neuropsychiatric Disorders / S. M. Goebel-Goody [et al.] // Pharmacological Reviews. – 2012. – Vol. 64. – P. 65–87.

75. Toll–like receptor–mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3 / M. Martin [et al.] // Nature immunology. – 2005. – Vol. 6. – №8. – P. 77–84.
76. Woodgett J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase–3/Factor A // The EMBO Journal. – 1990. – Vol. 9 – №8. – P. 2431–2438.

АНТИПЛАГИАТ
ТВОРИТЕ СОБСТВЕННЫМ УМОМ

Отчет о проверке на заимствования №1

Автор: nelubovmayakovscogo@mail.ru / ID: 6420122
Проверяющий: (nelubovmayakovscogo@mail.ru / ID: 6420122)

Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат»- http://users.antiplagiat.ru

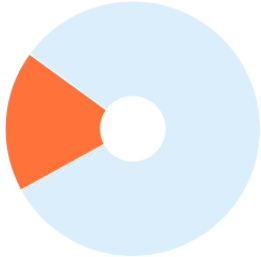
ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 4
Начало загрузки: 16.06.2019 22:55:56
Длительность загрузки: 00:00:05
Имя исходного файла: последний-конвертирован
Размер текста: 553 кБ
Символов в тексте: 63750
Слов в тексте: 7542
Число предложений: 933

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Последний готовый отчет (ред.)
Начало проверки: 16.06.2019 22:56:02
Длительность проверки: 00:00:04
Комментарии: не указано
Модули поиска: Модуль поиска Интернет

ЗАИМСТВОВАНИЯ	ЦИТИРОВАНИЯ	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ
17,68%	0%	82,32%



Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа.
Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Источник	Ссылка	Актуален на	Модуль поиска
[01]	5,58%	https://esu.citis.ru/dissertation/AQWPT4H8RI6A5VLZ84FMDI2I	https://esu.citis.ru	20 Мар 2018	Модуль поиска Интернет
[02]	3,95%	http://www.tnimc.ru/upload/dissovet/dissovet-mental/%D0%9F%D0%BE%D...	http://tnimc.ru	06 Ноя 2018	Модуль поиска Интернет
[03]	3,18%	Disruption of striatal-enriched protein tyrosine phosphatase (STEP) function ...	https://doi.org	04 Сен 2018	Модуль поиска Интернет

Еще источников: 17
Еще заимствований: 4,96%