

А. Н. Нестерович

**ВКЛАД ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СИСТЕМЫ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК
В ФОРМИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ
ШИЗОФРЕНИИ В СООТВЕТСТВИИ С ДИМЕНСИОНАЛЬНОЙ МОДЕЛЮ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В статье представлены результаты клинико-генетического исследования, в котором анализировалась взаимосвязь различных симптоматических дименсий шизофрении на этапе клинического исхода заболевания с полиморфными вариантами генов системы метилирования ДНК. Пациенты, страдающие шизофренией, обследованы клинически с помощью психометрических шкал SAPS/SANS, PANSS и генотипированы по генам DNMT3b (rs2424913), DNMT1 (rs2228612) и MTHFR (rs1801133). Метод сравнения средних и регрессионный анализ показали, что аллель T гена MTHFR определяет выраженность дименсии дезорганизации ($p < 0,05$); аллель G гена DNMT1 играет протективную роль в отношении позитивных симптомов шизофрении ($p < 0,05$), аллель T гена DNMT3b определяет выраженность негативных симптомов у лиц женского пола ($p < 0,05$).

Ключевые слова: шизофрения, дименсиональная модель, симптомы, гены, метилирование ДНК, метилтрансферазы.

А. N. Nestsiarovich

**THE CONTRIBUTION OF DNA METHYLATION SYSTEM GENES TO FORMATION
OF CLINICALLY POLYMORPHIC SCHIZOPHRENIA VARIANTS ACCORDING
TO DIMENSIONAL MODEL**

The article provides the results of clinical-genetic study in which the linkage was analyzed between different psychopathological dimensions of schizophrenia at the stage of its clinical outcome and polymorphic variants of DNA methylation system genes. Patients with schizophrenia were examined clinically with psychometrical scales SAPS/SANS, PANSS and genotyped for genes DNMT3b (rs2424913), DNMT1 (rs2228612) and MTHFR (rs1801133). The method of comparing means and regression analysis have shown that T allele of MTHFR determines disorganization severity ($p < 0,05$); G allele of DNMT1 plays protective role regarding positive symptoms development ($p < 0,05$); T allele of DNMT3b determines the severity of negative symptoms in females ($p < 0,05$).

Key words: schizophrenia, dimensional model, symptoms, genes, DNA methylation, methyltransferases.

Современные представления о патогенезе шизофрении базируются на эпигенетической концепции, согласно которой факторы окружающей среды способны влиять на реализацию исходного генетического материала организма посредством изменения экспрессии генов. В связи с этим растет интерес к метилированию ДНК как важнейшему посреднику в системе взаимодействий «ген – окружающая среда». Так, экспериментальные исследования показали, что стресс матери в период беременности, а также вариации материнской «заботы» в послеродовой период индуцируют стойкие изменения метилирования в гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системе взрослого потомства, что определяет их стрессоустойчивость, способы реагирования и поведения [10, 14, 16, 25]. Это позволяет предполагать, что особенности системы метилирования ДНК могут опосредовать действие средовых факторов риска шизофрении, являясь важным патогенетическим звеном, «объединяющим» каскад экзогенно-индуцированных и генетически обусловленных процессов.

Метилирование ДНК относится к системе «эпигенетического контроля» организма, осуществляющей регуляцию клеточной экспрессии генов во всех органах

и тканях. Это наиболее распространенная и стабильная эпигенетическая модификация геномной ДНК, функция которой заключается в подавлении экспрессии гена, т.е. поддержании «молчащего» состояния его транскрипционно активных участков [20]. Процесс включает присоединение метильной группы к цитозину в составе CpG-динуклеотида нити ДНК в позиции С5 пиримидинового кольца с помощью ферментов метилтрансфераз, распознавание метилированных участков ДНК специальными белками, содержащими метил-CpG-связывающие домены (MeCP2, MeCP1, protein Kaiso) и «рекрутирование» комплекса ко-репрессоров, среди которых важными являются деацетилазы гистоновых белков (HDACs) и белки, ремоделирующие хроматин. Результатом является локальная конденсация хроматина вокруг генного промотора и формирование его транскрипционно неактивной формы, т.е. гетерохроматина [21].

Первым этапом в процессе онтогенеза человека является тотальное деметилирование генома на стадиях первых делений зиготы, «обнажающее» исходный эпигенетический профиль ДНК. Далее на стадии имплантации бластоцисты происходит массовое метилирование de novo, профиль которого «выстраивается»

в процессе дифференцировки клеток и приобретает в результате тканеспецифичный характер [9]. В дальнейшем паттерны метилирования ДНК в клетке поддерживаются митотически, при этом все метилированные сайты генома условно объединяются в т.н. «метиломы», имеющие модульную структуру и содержащие своеобразный двухбуквенный «код» состоящий из метилированных и неметилированных CpG-динуклеотидов [11].

Предпосылками к изучению метилирования ДНК при шизофрении послужили данные о том, что в головном мозге уровень метилированного цитозина выше, чем в других органах и тканях (особенно в повторяющихся последовательностях ДНК) [17]; известно, что метилтрансферазы задействованы в процессах нейрогенеза, синаптической пластичности центральной нервной системы (ЦНС), нейронального прунинга, процессах обучения и запоминания; кроме того, при шизофрении отмечено снижение уровня метилирования генома в целом, а также локальное гипер- и гипометилирование промоторов отдельных генов (*GAD67*, *RELN* и *COMT* соответственно) [2].

В настоящей работе планируется проверить гипотезу о том, что клинический полиморфизм шизофрении может быть обусловлен генетическими особенностями системы метилирования ДНК. Известно, что проблема клинической гетерогенности заболевания является препятствием для выработки единой эффективной стратегии к его лечению и профилактике, кроме того, затрудняет объективизацию результатов большинства биологических и генетических исследований шизофрении, являясь причиной их низкой воспроизводимости.

Для решения данной проблемы использовалась дименсиональная модель шизофрении, регламентированная в 2005 году экспертами ВОЗ, в соответствии с которой основные симптомокомплексы заболевания выступают в качестве самостоятельных, относительно независимых размерностей – «дименсий» (англ. dimension – измерение), сгруппированных в соответствии с тремя психопатологическими осями – психотизм (бред, галлюцинации, идеаторные автоматизмы), дезорганизация (формальные расстройства мышления, странное поведение), негативные симптомы (аффективное уплощение, абулия-апатия, ангедония-асоциальность, бедность речи) [5]. Данный подход является относительно новым для клинко-генетических исследований в психиатрии и нуждается в эмпирическом подтверждении.

В контексте дименсиональной модели шизофрении решено исследовать полиморфизм трех генов системы метилирования ДНК: метилтрансфераз *DNMT3b* и *DNMT1*, а также фермента синтеза метионина *MTHFR*. Остановимся подробнее на основных характеристиках изучаемых генов.

ДНК метилтрансфераза 3b (*DNMT3b*) осуществляет метилирование ДНК *de novo*, «работает» преимущественно в сателлитных повторах, активно экспрессируется на ранних этапах нейрогенеза в нейронах и олигодендроцитах [11]. Ген *DNMT3b* является одним из генов-кандидатов шизофрении, проявившим ассоциацию с заболеванием в выборке лиц китайской [26] и индийской национальностей [19]. Аналогичных исследова-

ний в европейской популяции, по известным нам данным, не проводилось. Ген *DNMT3b* локализован на хромосоме 20q11.2, состоит из 23 экзонов и 22 интронов и имеет протяженность около 47kb геномной ДНК. Его локус rs2424913 является одним из наиболее широко изучаемых и располагается в промоторном регионе гена, на расстоянии -149 пар оснований от стартового сайта транскрипции. В исследованиях *in vitro* установлено, что однонуклеотидная замена C→T (149C > T) связана с увеличением промоторной активности гена примерно на 30% [24]. Частота аллеля T в европейской популяции составляет 41% [3].

ДНК метилтрансфераза 1 (*DNMT1*) обеспечивает «поддерживающее» метилирование в процессе репликации ДНК как на ранних этапах онтогенеза, так и у взрослой особи. В делящейся клетке фермент концентрируется на репликационной вилке в S-фазу клеточного цикла и метилирует вновь синтезированную ДНК, используя в качестве шаблона материнскую цепь. Не смотря на субстратное сродство *DNMT1* к полу-метилированной ДНК, полагают, что данный фермент также способен осуществлять метилирование *de novo* [13]. Повышение экспрессии фермента приводит к гиперметилированию CpG островков в человеческом геноме [23]. Ген *DNMT1* локализован на хромосоме 19p13.3-p13.2 и кодирует белок, состоящий из двух доменов – большего N-терминального регуляторного региона и меньшего C-терминального каталитического региона. Полиморфизм локуса rs2228612 (+32204GG, A201G) гена *DNMT1* относительно редко упоминается в научной литературе, однако, в противоположность более «популярным» локусам rs2228611, 2228613, rs4804490, rs2241531, rs2114724 и др., он локализуется в экзоне (кодирующей части гена) и относится к несинонимичной замене нуклеотида, приводящей к синтезу новой аминокислоты; при этом сочетание аллелей GG в некоторых исследованиях оказалось сопряжено со значительным снижением глобального уровня метилирования ДНК, по сравнению с сочетанием аллелей AA [7]. Для данного полиморфизма описаны альтернативные аминокислотные замены (A/C/G/T), при этом известная частота минорного аллеля (C) составляет около 6% в европейской популяции и 18% во всем мире [3].

Метилтетрагидрофолатредуктаза (*MTHFR*) является ключевым ферментом однокрабового цикла (рис. 1), в котором синтезируется метионин и SAM (S-adenosyl-L-methionine) – основной донор метильных групп для всех реакций метилирования.

Ген *MTHFR* (methylenetetrahydrofolate reductase) расположен на коротком плече первой хромосомы (1p36.3), и является одним из наиболее надежных генов-кандидатов шизофрении базы данных «SZGene database» [4]. Наиболее изученный его полиморфизм – rs1801133 (C677T) – замена цитозина (C) на тимидин (T) в позиции 677, приводящая к замене аминокислоты аланин на валин (Ala222Val) в каталитическом регионе белкового продукта гена. Показано, что энзиматическая активность фермента *MTHFR* у гетерозигот C/T снижена до 65%, а у гомозигот T/T – до 30% от нормального уровня [22]. Распространенность генотипа TT среди пред-

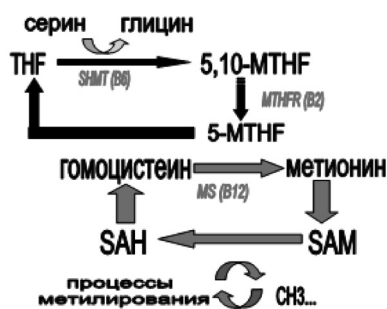


Рис. 1. Однокарбоновый цикл

В6-зависимая серин-гидрокси-метилтрансфераза (SHMT) катализирует превращение серина в глицин. При этом тетрагидрофолат (THF) превращается в 5,10-MTHF (5,10-метилтетрагидрофолат). Последний с помощью В2-зависимой метилтетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) превращается в 5-MTHF (5-метилтетрагидрофолат) – донор метильной группы для реметилирования гомоцистеина в метионин. Метионин посредством метионин-аденозилтрансферазы превращается в SAM (S-аденозилметионин) – основной донор метильных групп для процессов метилирования ДНК. Освободившись от метильной группы SAM превращается в SAH, который вновь подвергается процессу метилирования с участием фермента MS (В12-зависимой метионин-синтазы)

ставителей европеоидной расы составляет около 10% [18], в том числе, среди популяции русских – 13% (распространенность аллеля Т – 32%) [22]. Имеются данные о том, что генотип ТТ гена *MTHFR* сопряжен с более чем двухкратным повышением уровня гомоцистеина в крови, по сравнению с гомозиготами по аллелю С [15]. Этот факт традиционно интерпретируется в ключе нейротоксической теории патогенеза шизофрении, поскольку гомоцистеин проявил нейротоксичность в исследованиях *in vitro*, а саму гипергомоцистеинемию, способную вызывать шизофреноподобные психозы [8], относят к самостоятельным факторам риска шизофрении. Кроме того, отмечается, что, генетически детерминированное снижение синтеза метионина в однокарбовом цикле закономерно приводит к недостатку глобального метилирования ДНК [6].

Цель работы – определить вклад полиморфизма генов системы метилирования ДНК (*DNMT3b* (rs2424913), *DNMT1* (rs2228612) и *MTHFR* (rs1801133)) в формирование трех психопатологических дименсий шизофрении (психотизм, дезорганизация, негативные симптомы) у лиц, достигших этапа клинического исхода заболевания.

Материалы и методы

Клинически обследовано 336 пациентов (174 женщины и 162 мужчин), проходивших курс лечения в РНПЦ психического здоровья с верифицированным диагнозом «шизофрения», установленным в соответствии с критериями МКБ-10. Участие пациентов в исследовании одобрено этической комиссией при РНПЦ психического здоровья, все обследуемые дали соответствующее письменное информированное согласие. Изучение особенностей клинической картины заболевания решено проводить на этапе «клинического исхода», который, согласно современным представлениям, наступает че-

рез 12–15 лет после первичной манифестации психотических симптомов [12].

При формировании исследовательской выборки производилась стратификация по факторам возраста пациентов (18–65 лет), длительности заболевания (более 12 лет), приверженности медикаментозной терапии (нерегулярный прием нейролептиков в 1–3 недели, предшествующие госпитализации, и в более отдаленном анамнезе), отсутствия сопутствующих психических и неврологических расстройств (кроме злоупотребления никотином), отсутствия обострения соматического заболевания.

Дизайн исследования – клинико-генетическое, обсервационно-аналитическое, поперечное, «случай-контроль»; при сборе анамнестических сведений о пациентах использовался ретроспективный метод. Группы сравнения были представлены пациентами с различным сочетанием аллелей исследуемых генов. Кроме того, проводилось построение линейной регрессионной модели как для всей выборки в целом, так и отдельно для мужчин и женщин.

Для оценки выраженности симптомов шизофрении использовались следующие шкалы:

Шкала для оценки позитивных и негативных симптомов PANSS (the Positive And Negative Syndrome Scale) (Kay S. R., Fiszbein A., Opler L. A., 1987). Шкала состоит из 33 признаков, каждый из которых оценивается от 1 до 7 баллов, и четырех субшкал – позитивных симптомов (П), негативных симптомов (Н), общей психопатологической симптоматики (О) и дополнительных признаков (Д). Для оценки симптомов использовалось полуструктурированное клиническое интервью (Kay S. R., Opler L. A., Fiszbein A., 1986). Всего с помощью данной шкалы обследован 151 пациент.

Шкала для оценки негативных симптомов (SANS, the Scale for the Assessment of Negative Symptoms) и шкала для оценки позитивных симптомов (SAPS, the Scale for the Assessment of Positive Symptoms) (Andreasen N. et al., 1982). Используемая шкала SANS включает 4 симптома (аффективное уплощение, абулия-апатия, ангедония-асоциальность, алогия), оцениваемых по 18 признакам; шкала SAPS также включает 4 симптома (бред, галлюцинации, позитивные формальные расстройства мышления, странное поведение), оцениваемые по 30 признакам. Каждый из 48 признаков заболевания оценивался по 6-бальной шкале (от 0 до 5 баллов): 0 – отсутствие признака, 1 – сомнительная патология, 2 – легкая степень, 3 – средняя степень, 4 – значительная выраженность, 5 – тяжелая степень нарушения. Симптом «нарушение внимания» оценивался отдельно с помощью нейрокогнитивных тестов, его балл не учитывался при статистических расчетах.

Каждый симптом SAPS/SANS оценивался с помощью **суммарного** балла (сумма всех входящих в симптом признаков) и **глобального** балла от 0 до 5 (на основании общего клинического впечатления). Каждая дименсия шизофрении оценивалась с помощью **суммы глобальных баллов** входящих в нее симптомов (психотизм = «галлюцинации» + «бред», дезорганизация = «формальные расстройства мышления» + «странное поведение», негативные симптомы = «аффективное

уплощение» + «алогия» + «апатия-абулия» + «ангедония-асоциальность»), а также с помощью **общего суммарного** балла (совокупность суммарных баллов всех симптомов, составляющих дименсию) и **глобального** балла от 0 до 5 (на основании общего клинического впечатления).

Пациенты были обследованы в период очередного манифестного эпизода шизофрении («обострения») после стабилизации психического состояния, главным критерием которой являлась относительная редукция симптоматики, препятствующей продуктивному контакту с пациентом и оценке особенностей его мышления и речи (интенсивные галлюцинации, психомоторное возбуждение, выраженная тревога, мутизм и др.) – таким образом, более «яркие» проявления заболевания не «перекрывали» остальные симптомы.

Поскольку, согласно рекомендациям по использованию шкал SAPS и SANS, оценка симптоматики должна производиться за весь месяц, предшествующий интервью, а при использовании шкалы PANSS – за неделю до интервью [1], различные проявления шизофрении оценивались за различные периоды времени. Так, «формальные расстройства мышления», «аффективное уплощение» и «алогия» шкал SAPS/SANS оценивались на момент обследования; «апатия-абулия», «ангедония-асоциальность», странное и агрессивное поведение оценивались с учетом анамнестических данных (ретроспективно) (со слов пациента и его родственников, из медицинской документации) – например, такие проявления заболевания, как необычная манера одеваться, склонности к делинквентному поведению, частая смена мест работы, отсутствие социальных контактов или бытовая беспомощность, могут быть объективно оценены именно «в длиннике» заболевания, с учетом информации от ближайшего окружения больного. Психотическая продукция оценивалась в «худшем» состоянии пациента – т.е. по максимальным проявлениям на момент поступления пациента в клинику (из направления, данных первичного осмотра, со слов пациента и его родственников).

Для минимизации влияния поддерживающей терапии нейролептиками на течение и патоморфоз заболевания, обследовались пациенты, которые не соблюдали в домашних условиях предписанный им режим приема поддерживающей антипсихотической терапии; данная информация уточнялась со слов родственников пациентов и их ближайшего окружения, из медицинской документации (в т.ч. направления в стационар).

У всех обследуемых производился забор венозной крови в количестве 1–2мл на целлюлозный носитель. Полиморфизм генов *DNMT3b* (rs2424913), *DNMT1* (rs2228612) и *MTHFR* (rs1801133) определялся в лаборатории нехромосомной наследственности Института генетики и цитологии НАН РБ путем полимеразной цепной реакции. Исследование финансировалось в рамках гранта Белорусского Фонда Фундаментальных исследований (№М13М-065 от 16.04.2013). Кроме пациентов, по генам *DNMT3b* и *MTHFR* генотипирована группа контроля (300 человек), которая включала условно психически здоровых индивидов, не имеющих официально

установленного психиатрического диагноза и не обращавшихся когда-либо за помощью в учреждения здравоохранения, относящиеся к сфере оказания психиатрической помощи. Данные субъекты были представлены добровольцами различных социо-демографических групп – студенты, работники медицинских и научных учреждений и их родственники.

В зависимости от генотипа *DNMT3b* каждый из обследуемых был отнесен к группе гомозигот СС, либо к группе «носителей» аллеля Т (гетерозиготы СТ + гомозиготы ТТ), имеющих повышенную активность одноименного метилирующего фермента. Аналогично сравнивались носители аллеля Т по гену *MTHFR* с остальной частью выборки, а также носители генотипов АА и АГ по гену *DNMT1*. В генетически разнородных группах сравнивались показатели выраженности 48 признаков шизофрении, суммарные и глобальные баллы восьми симптомов шизофрении, общий суммарный и глобальный баллы трех психопатологических дименсий по шкалам SAPS/SANS, а также все признаки и субшкалы PANSS.

Для статистической обработки данных использовалась программа Statistical Package for the Social Science (SPSS'16). Применялись таблицы сопряженности с хи-квадратом χ^2 Пирсона, метод сравнения средних рангов Манна-Уитни (Mann-Whitney test). Для определения вклада генетического полиморфизма в выраженность дименсий шизофрении использовался линейный регрессионный анализ, в котором в качестве зависимой переменной (y) выступала выраженность каждой из трех изучаемых дименсий, описываемая через сумму глобальных баллов соответствующих симптомов. В качестве независимых переменных (x_1, x_2, x_3) выступали три показателя – носительство аллеля Т по гену *DNMT3b* (генотипы СТ+ТТ), носительство аллеля G по гену *DNMT1* (генотип АГ), носительство аллеля Т по гену *MTHFR* (генотипы СТ+ТТ).

Результаты и обсуждение

Распределение генотипов по локусу rs2424913 гена *DNMT3b* в выборке здоровых лиц ($N = 300$) оказалось следующим: гомозиготы СС – 102 человека (34%), гетерозиготы СТ – 146 человек (48,7%), гомозиготы по аллелю Т (ТТ) – 52 человека (17,3%). Распределение тех же генотипов в группе лиц, страдающих шизофренией ($N = 234$), оказалось следующим: гомозиготы СС – 71 человек (30,3%), гетерозиготы СТ – 115 человек (49,1%), гомозиготы ТТ – 48 человек (20,5%). Таким образом, носители аллеля Т, имевшие повышенную активность метилирующего фермента *DNMT3b*, составили 52,8%. Как видно, доминирующим вариантом генотипа в обеих выборках являлся СТ (гетерозиготы). Генотип ТТ исследуемого гена встречался чаще среди лиц, страдающих шизофренией, по сравнению со здоровыми субъектами (20,5% vs. 17,3%), однако данное различие не достигло статистически значимых значений ($p < 0,05$).

Частота встречаемости аллеля Т локуса – 149С > Т (rs2424913) в группе здоровых лиц составила 41,67%, что соответствует данным, известным для европейской популяции (около 42%). В группе лиц, страдающих шизофренией, распространенность аллеля Т составила

45,1%, что незначительно превышает аналогичный показатель для группы контроля.

Достоверной ассоциации носительства аллеля Т с клиническими дименсиями шизофрении выявлено не было, однако при разделении исследуемой выборки по половому признаку обнаружены противоположные взаимосвязи в отношении мужчин и женщин. Так, носи-

тели аллеля Т **женского пола** имели достоверно более выраженные проявления негативной симптоматики, по сравнению с остальной женской частью выборки, в то время, как мужчины-носители аллеля Т отличались меньшей выраженностью дефицитарных симптомов, по сравнению с остальными лицами мужского пола (см. табл. 1 и 2).

Таблица 1. Клинические особенности пациентов с шизофренией женского пола (N = 124), отличающихся сочетанием аллельных вариантов гена DNMT3b (средние ранги теста Mann-Whitney)

Дименсии и их симптомы/признаки	CC	CT+TT	P =	Mann-Whitney U	N =
Апатия-абулия, глобальный балл SANS	51,86	66,69	0,031	1 185,000	124
Бедность зрительного контакта, SANS	49,94	59,67	0,027	1052,000	113
Физическая анергия, SANS	43,76	62,01	0,007	860,500	113
Трудности в общении PANSS	32,80	44,69	0,031	468,500	82
Депрессия PANSS	30,35	46,47	0,005	422,000	83
Нарушения внимания PANSS	31,5	45,17	0,018	440 000	82
Нарушения воли PANSS	31,61	45,13	0,018	442,500	82
PANSS O суммарный балл	30,30	47,10	0,005	421,000	84
PANSS общий балл	33,02	46,07	0,029	483,500	84

Таблица 2. Клинические особенности пациентов с шизофренией мужского пола (N = 110), отличающихся сочетанием аллельных вариантов гена DNMT3b (средние ранги теста Mann-Whitney)

Дименсии и их симптомы/признаки	CC	CT+TT	P =	Mann-Whitney U	N =
Аффективное уплощение, суммарный балл SAPS	59,42	46,10	0,031	811,000	100
Ангедония-асоциальность, глобальный балл SANS	64,5	51,12	0,032	1008,000	110
Недостаточность речевых интонаций SANS	59,11	46,26	0,033	821,500	100
Нарушения воли PANSS	42,42	31,04	0,02	362,000	69

Распределение генотипов по локусу rs2228612 гена DNMT1 в выборке лиц, страдающих шизофренией (N = 151), оказалось следующим: AA – 137 человек (90,7%), AG – 14 человек (9,3%). Тщательный анализ электрограмм не выявил случаев сочетания аллелей GG. Носители аллеля G, ассоциированного с пониженной активностью метилирующего фермента, имели досто-

верно более низкую выраженность позитивных симптомов шизофрении, в частности, бредовых идей, по сравнению с остальной частью выборки (табл. 3). Данная категория пациентов имела более высокие показатели апатии-абулии и ангедонии-асоциальности, однако статистически достоверные отличия обнаружены лишь для признака «снижение настойчивости в труде и учебе».

Таблица 3. Клинические особенности пациентов с шизофренией, отличающихся сочетанием аллельных вариантов гена DNMT1 (средние ранги теста Mann-Whitney)

Дименсии и их симптомы/признаки	AA	AG	P =	Mann-Whitney U	N =
Бредовые идеи, глобальный балл SAPS	78,30	53,46	0,036	643,5	151
Бредовые идеи, суммарный балл SAPS	78,46	51,96	0,031	622,5	151
Бредовые идеи PANSS	78,41	52,46	0,029	629,5	151
Бред воздействия SAPS	78,35	53,00	0,030	637,0	151
Позитивные симптомы, сумма глобальных баллов SAPS	78,83	48,32	0,012	571,5	151
Позитивные симптомы, суммарный балл SAPS	78,51	51,43	0,027	615,0	151
Снижение настойчивости в труде и учебе SANS	73,69	98,61	0,036	642,5	151

Распределение генотипов по локусу rs1801133 гена MTHFR в выборке здоровых лиц (N = 300) оказалось следующим: гомозиготы CC – 143 человека (47,7%), гетерозиготы CT – 128 человек (42,7%), гомозиготы по аллелю Т (TT) – 29 человек (9,7%). Те же генотипы среди пациентов (N = 286) распределились следующим образом: гомозиготы CC – 135 человек (47,2%), гетерозиготы CT – 124 человека (43,4%), гомозиготы TT – 27 человек (9,4%). Частота аллеля Т составила у здоровых – 31%,

у пациентов с шизофренией – 31,1%. Таким образом, достоверных различий в частоте встречаемости различных вариантов генотипов между здоровыми лицами и пациентами с шизофренией не обнаружено.

Носители аллеля Т по гену MTHFR имели достоверно более выраженные глобальные баллы странного поведения, формальных расстройств мышления, а также суммарный балл дименсии дезорганизации по шкале SAPS (табл. 4).

Таблица 4. Клинические особенности пациентов с шизофренией, отличающихся сочетанием аллельных вариантов гена *MTHFR* (средние ранги теста Mann-Whitney)

Дименсии и их симптомы/признаки	СС	СТ+ТТ	P =	Mann-Whitney U	N =
Странное поведение, глобальный балл SAPS	133,23	152,68	0,04	8 806,5	286
Формальные расстройства мышления, глобальный балл SAPS	122,24	162,51	0,00	7322,5	286
Формальные расстройства мышления, суммарный балл SAPS	90,47	125,55	0,00	3 934,500	216
Суммарный балл дезорганизация SAPS	90,75	124,46	0,00	3 964,000	216
Смысловые соскальзывания SAPS	93,29	127,62	0,00	4 204,000	221
Ответы по касательной SAPS	95,18	124,75	0,000	4 418,000	220
Разорванность мышления SAPS	95,31	123,53	0,001	4 443,000	219
Паралогичность SAPS	98,47	125,33	0,002	4 758,000	224
Обстоятельность SAPS	95,60	122,65	0,000	4 463,000	218
Речевой напор SAPS	97,69	125,68	0,000	4 653,500	223
Отвлекаемость SAPS	101,42	117,15	0,043	5 079,500	218
Дезорганизация PANSS	62,32	90,23	0,000	1 796,000	151
Манерность и поза PANSS	68,03	85,20	0,005	2 235,000	152

Построение линейной регрессионной модели в отношении дименсии психотизма в общей выборке показало, что в большей степени выраженность бреда и галлюцинаций определяется геном *DNMT1* (табл. 5), где генотип AG играет протективную роль.

Таблица 5. Параметры регрессионной модели, построенной для дименсии позитивных симптомов шизофрении

	Коэффициент В	Стандартная ошибка	t-статистика	P =
Носительство аллеля Т <i>DNMT3b</i>	-0,005	0,377	-0,012	0,990
Генотип AG <i>DNMT1</i>	-1,560	0,603	-2,590	0,011
Носительство аллеля Т <i>MTHFR</i>	0,069	0,350	0,197	0,844

Построение линейной регрессионной модели в отношении дименсии дезорганизации показало, что в большей степени выраженность нарушений мышления и поведения при шизофрении определяется геном *MTHFR* (табл. 6), где носительство аллеля Т является фактором риска.

Таблица 6. Параметры регрессионной модели, построенной для дименсии дезорганизации при шизофрении

	Коэффициент В	Стандартная ошибка	t-статистика	P =
Носительство аллеля Т <i>DNMT3b</i>	0,563	0,353	1,593	0,113
Генотип AG <i>DNMT1</i>	0,247	0,565	0,437	0,663
Носительство аллеля Т <i>MTHFR</i>	0,980	0,328	2,987	0,003

Построение линейной регрессионной модели в отношении дименсии негативных симптомов шизофрении в общей выборке показало, что в большей степени выраженность данной размерности определяется геном *DNMT1* (табл. 7), где носительство аллеля G является фактором риска.

При построении аналогичной регрессионной модели для выборки женщин обнаружено, что в наибольшей степени выраженность негативной симптоматики определяется носительством аллеля Т гена *DNMT3b* (табл. 8)

Таблица 7. Параметры регрессионной модели, построенной для дименсии негативных симптомов шизофрении для общей выборки (мужчины и женщины)

	Коэффициент В	Стандартная ошибка	t-статистика	P =
Носительство аллеля Т <i>DNMT3b</i>	0,068	0,669	0,102	0,919
Генотип AG <i>DNMT1</i>	0,520	1,070	0,486	0,627
Носительство аллеля Т <i>MTHFR</i>	0,046	0,621	0,073	0,942

Таблица 8. Параметры регрессионной модели, построенной для дименсии негативных симптомов шизофрении для выборки женщин

	Коэффициент В	Стандартная ошибка	t-статистика	P =
Носительство аллеля Т <i>DNMT3b</i>	2,290	0,811	2,823	0,006
Генотип AG <i>DNMT1</i>	1,881	1,337	1,366	0,176
Носительство аллеля Т <i>MTHFR</i>	0,516	0,727	0,710	0,480

В выборке мужчин носительство аллеля Т гена *DNMT3b* проявило протективную роль в отношении развития негативной симптоматики (табл. 9).

Таблица 9. Параметры регрессионной модели, построенной для дименсии негативных симптомов шизофрении для выборки мужчин

	Коэффициент В	Стандартная ошибка	t-статистика	P =
Носительство аллеля Т <i>DNMT3b</i>	-2,117	1,043	-2,031	0,046
Генотип AG <i>DNMT1</i>	-0,673	1,581	-0,425	0,672
Носительство аллеля Т <i>MTHFR</i>	-0,412	1,038	-0,397	0,693

Полученные данные о клинико-генетических взаимосвязях проанализируем с точки зрения эпигенетического подхода, фокусируясь на генетически детерминированных особенностях метилирования ДНК.

Преимущественный вклад аллеля Т гена *MTHFR* в развитие синдрома дезорганизации при шизофрении

позволяет говорить о патогенетической автономности данной дименсии, наличии независимых и специфических для нее генетических предикторов. Генетически детерминированное снижение активности фермента MTHFR приводит не только к глобальному гипометилированию генома, но имеет следствием накопление неизрасходованных продуктов однокарбонового цикла, в частности, гомоцистеина – агониста NMDA-глутаматных рецепторов ЦНС. Можно предполагать, что именно эта биохимическая особенность, приводящая к дисбалансу в системе центральной нейротрансмиссии, приводит к развитию специфических нарушений поведения и мышления при шизофрении (смысловые соскальзывания, ответы по касательной, разорванность, паралогичность, обстоятельность, речевой напор, отвлекаемость).

Гипометилирование ДНК может также приводить к неконтролируемой экспрессии отдельных функционально значимых генов, в особенности тех из них, промоторы которых изначально гипометилированы при шизофрении (например гена *COMT*, Catechol-O-methyltransferase). Повышение экспрессии гена *COMT* приводит к ускоренной деградации дофамина в синапсах префронтальной коры, что в свою очередь может обуславливать нарушения процессов фильтрации и обработки информации, когнитивный дефицит, - подобные аномалии привычно трактуются в контексте негативных симптомов шизофрении, однако полученные данные демонстрируют возможную их вовлеченность в развитие специфических расстройств мышления и поведения. Ослабленный эпигенетический контроль над «транскрипционным шумом», отражающим распределение нормальных паттернов генной экспрессии клеток головного мозга, может приводить к разобщению и десинхронизации функциональных нейрональных сетей, как на электрофизиологическом, так и на биохимическом уровне.

Генетически детерминированное снижение активности метилирующего фермента DNMT1 способно приводить к гипометилированию ГАМКергических интернейронов и пирамидных нейронов головного мозга как в раннем онтогенезе, так и на протяжении жизни индивида. Повышение функциональной активности ГАМКергических нейронов имеет следствием усиление синтеза ГАМК (основного тормозного нейромедиатора ЦНС) и подавление избыточной активности пирамидных нейронов коры головного мозга клетками-канделябрами. Следствием этого может явиться протективный эффект в отношении продуктивной психотической симптоматики, в частности, бредовых идей, возникающих как «продукт» патологической системы, формирующейся в ассоциативных зонах коры головного мозга и подкрепляемой патологической импульсацией со стороны базальных ганглиев. Иными словами, можно предполагать, что активная тормозная афферентация, поступающая в кору головного мозга от ГАМКергических нейронов нивелирует существующие при шизофрении биологические предпосылки к формированию патологических представлений и идеаторных автоматизмов. Таким образом, аллель G гена *DNMT1* выступает в роли протективного фактора по отношению к дименсии психотизма.

Связь между негативными симптомами шизофрении у женщин и полиморфизмом гена *DNMT3b* также опосредована механизмами метилирования ДНК и регуляцией генной экспрессии. Однако в данном случае речь идет о ранних этапах эмбриогенеза, когда четкая функциональная «иерархия» нейронов ЦНС еще не установлена и критическое значение имеет сбалансированная координация всех этапов миграции, дифференцировки клеток и установления синаптических связей между ними. Генетически детерминированное повышение активности метилирующего фермента DNMT3b на ранних стадиях онтогенеза приводит к глобальному гиперметилированию генома. Принимая во внимание данные о том, что уровень метилирования ДНК изначально выше в головном мозге и особенно в сателлитных повторах, где наиболее активно «работает» DNMT3b, можно предполагать, что данное изменение отразится, прежде всего, на паттернах метилирования в центральной нервной системе, снижая экспрессию генов, продукты которых функционально задействованы в процессах нейрогенеза (что следует из известной для метилирующих ферментов роли в ЦНС). Поскольку клиническим следствием данных процессов при шизофрении является половой диморфизм (т.е. развитие различных симптомов у мужчин и у женщин), можно предположить, что среди «мишеней» гиперметилирования могут быть т.н. «псевдоаутосомные» регионы второй X хромосомы у особей женского пола – участки ДНК, которым удается сохранить свою активность после деактивации второй X хромосомы, происходящей в норме. Подавление генной экспрессии на данных участках хромосомы может обуславливать развитие специфических для шизофрении аномалий, таких как снижение энергетического потенциала и волевых побуждений, нарушения коммуникации с внешним миром, обеднение интересов, аутизацию, что на уровне социальных отношений проявляется в пассивном образе жизни, неспособности трудиться и реализовывать семейные роли, пренебрежении общественными обязанностями и собственными нуждами. Поскольку, согласно традиционным представлениям, процесс метилирования является наиболее стабильной эпигенетической модификацией ДНК, эпигенетические аномалии на ранних стадиях нейрогенеза могут оказаться первичным и ключевым звеном в цепи дизонтогенетических событий, приводящих к развитию неблагоприятного варианта шизофрении с активно прогрессирующей негативной симптоматикой, достигающей к моменту клинического исхода степени выраженного волевого дефицита.

Таким образом, полиморфизм генов системы метилирования ДНК не только создает предпосылки для эпигенетических и метаболических аберраций в центральной нервной системе при шизофрении, но и определяет специфику течения различных периодов онтогенеза, предрасполагая к развитию симптомов определенной психопатологической дименсии. Установление соответствующих генотипов имеет прогностическую значимость у лиц с впервые установленным диагнозом «шизофрения» и позволит дифференцированно подходить к профилактике и лечению заболевания, с учетом прогнозируемой «траектории риска».

Выводы

1. Психопатологические дименсии шизофрении имеют независимые генетические детерминанты.

2. Выраженность отдельных симптоматических дименсий шизофрении, а также феномен полового диморфизма заболевания на этапе клинического исхода определяются полиморфизмом генов системы метилирования ДНК.

3. Выраженность дименсии негативных симптомов шизофрении у женщин на этапе клинического исхода заболевания определяется наличием аллеля Т (rs2424913) гена *DNMT3b*, ассоциированного с повышенной активностью одноименного метилирующего фермента. У мужчин данный аллель играет протективную роль в отношении развития негативных симптомов. Данные различия объясняются гиперметилированием псевдоаутосомных регионов второй X хромосомы на ранних этапах эмбриогенеза у лиц женского пола, действующих в регуляции функций коры головного мозга.

4. Протективную роль в отношении развития позитивной симптоматики шизофрении играет наличие минорного аллеля G (rs2228612) гена *DNMT1*, ассоциированного со сниженной активностью одноименного метилирующего фермента. Данный эффект объясняется гипометилированием генома и повышением тормозной афферентации ГАМКергических интернейронов головного мозга.

5. Выраженность дименсии дезорганизации при шизофрении определяется наличием аллеля Т (С677Т) гена *MTHFR*, связанного с пониженной активностью одноименного фермента синтеза метионина. Данный эффект объясняется как глобальным гипометилированием ДНК, так и гипергомоцистеинемией.

6. Генотипирование полиморфных локусов генов системы метилирования ДНК (*DNMT3b*, *DNMT1*, *MTHFR*) на ранних этапах манифестации шизофрении целесообразно проводить для более точного прогнозирования динамики заболевания и типа возможного клинического исхода.

Литература

1. Мосолов, С. Н. Шкалы психометрической оценки симптоматики шизофрении и концепция позитивных и негативных расстройств. – 2001. – М. – 238 с.
2. Нестерович, А. Н. Роль метилирования ДНК в функционировании головного мозга. – Вестник Фонда Фундаментальных исследований. – 2014. – № 1. – С. 57–70.
3. <http://browser.1000genomes.org>
4. Allen, N. C. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database / N. C. Allen [et al.] // *Nat Genet.* – 2008. – Vol. 40. – P. 827–34.
5. Andreasen, N. C. Remission in Schizophrenia: Proposed Criteria and Rationale for Consensus / N. C. Andreasen [et al.] // *The American Journal of Psychiatry.* – 2005. – № 162. – P. 441–449.
6. Applebaum, J. Homocysteine levels in newly admitted schizophrenic patients / J. Applebaum [et al.] // *J. Psychiatr. Res.* – 2004. – Vol. 38 (4). – P. 413–416.
7. Arakawa, Y. Association of polymorphisms in *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *MTHFR* and *MTRR* genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease / Y. Arakawa [et al.] // *Clin Exp Immunol.* – 2012. – Vol. 170 (2). – P. 194–201.
8. Bonig, H. Psychotic symptoms in severe *MTHFR* deficiency and their successful treatment with betaine / H. Bonig [et al.] // *Eur J Pediatr.* – 2003. – Vol. 162. – P. 200–201.

9. Dong, E. Reelin and glutamic acid decarboxylase67 promoter remodeling in an epigenetic methionine-induced mouse model of schizophrenia / Dong [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Science USA.* – 2005. – Vol. 102 (35). – P. 12578–12583.

10. Fagiolini, M. Epigenetic influences on brain development and plasticity / M. Fagiolini [et al.] // *Current Opinion in Neurobiology.* – 2009. – Vol. 19. – P. 207–212.

11. Feng, J. Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases *Dnmt3a* and *Dnmt3b* in the central nervous system / J. Feng [et al.] // *J. Neurosci. Res.* – 2005. – Vol. 79. – P. 734–746.

12. Hopper, K., Harrison, G., Janca, A., Sartorius, N. Recovery from schizophrenia. An international perspective. A report from the WHO collaborative project, the international study of schizophrenia. Oxford University press; 2007.

13. Liang, G. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements / G. Liang [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2002. – Vol. 22. – P. 480–491.

14. McGowan, P. O. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse / P. O. McGowan [et al.] // *Nature Neuroscience.* – 2009. – Vol. 12. – P. 342–348.

15. Morita, H. Genetic Polymorphism of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (*MTHFR*) as a Risk Factor for Coronary Artery Disease / H. Morita [et al.] // *Circulation.* – 1997. – Vol. 95. – P. 2032–2036.

16. Oberlander, T. Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) and infant cortisol stress responses / T. Oberlander [et al.] // *Epigenetics.* – 2008. – Vol. 3. – P. 97–106.

17. Ono, T. Biological significance of DNA methylation in the ageing process / T. Ono [et al.] // *Age Ageing.* – 1993. – Vol. 22. – P. S34–S43.

18. Roffman, J. L. *MTHFR* 677C>T effects on anterior cingulate structure and function during response monitoring in schizophrenia: a preliminary study / J. L. Roffman [et al.] // *Brain Imaging and Behavior.* – 2011. – Vol. 5. – P. 65–75.

19. Saradalekshmi, K. R. DNA methyltransferase (*DNMT*) gene polymorphisms could be a primary event in epigenetic susceptibility to schizophrenia / K. R. Saradalekshmi [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9 (5). – P. 1–8.

20. Sharma, R. P. CpG Methylation in Neurons: Message, Memory, or Mask? / R. P. Sharma [et al.] // *Neuropsychopharmacology.* – 2010. – Vol. 35. – P. 2009–2020.

21. Tost, J. DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker / J. Tost // *Mol Biotechnol.* – 2010. – Vol. 44. – P. 71–81.

22. Trifonova, E. A. Genetic Diversity and the Structure of Linkage Disequilibrium in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Locus / E. A. Trifonova [et al.] // *Russian Journal of Genetics.* – 2008. – Vol. 44 (10). – P. 1224–1232.

23. Vertino, P. De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase / P. Vertino [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 1996. – Vol. 16. – P. 4555–65.

24. Wang, L. Functional relevance of C46359T in the promoter region of human *DNMT3B6* / L. Wang [et al.] // *Proc AACR [Abstract].* – 2004. – Vol. 45. – P. 2913.

25. Weaver, I. Epigenetic programming by maternal behavior / I. C. Weaver [et al.] // *Nat Neurosci.* – 2004. – Vol. 7. – P. 847–854.

26. Zhang, C. DNA methyltransferase 3B gene increases risk of early onset schizophrenia / C. Zhang [et al.] // *Neuroscience Letters.* – 2009. – Vol. 462. – P. 308–311.

Поступила 11.06.2015 г.