

Doi: 10.31116/tsitol.2018.05.08

**ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ rs6311 и rs6313 ГЕНА
РЕЦЕПТОРА СЕРТОНИНА 2А (HTR2A) НА УРОВЕНЬ ЕГО мРНК И БЕЛКА
В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ТЕРАПИИ АНТИПСИХОТИКАМИ**

© А. М. Заботина,^{1,2,*} М. А. Белинская,¹ А. С. Журавлев,¹ Р. Ф. Насырова,³
Д. Н. Сосин,³ Е. Е. Ершов,⁴ А. Е. Тараскина,¹⁻³ Е. М. Крупицкий³

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

² Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022,

³ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии
и неврологии им. В. М. Бехтерева, Санкт-Петербург, 192019, и

⁴ С.-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения
«Психиатрическая больница № 1 им. П. П. Кащенко»,
Ленинградская обл., Гатчинский р-н, с. Никольское, 188357;
* электронный адрес: a.zabotina@gmail.com

Рецептор 5-гидрокситрипamina (серотонина) 2А (5-HTR_{2A}) является ключевым рецептором, участвующим в моноаминергической регуляции организма, определяющей биологические функции и поведение человека, мишенью действия атипичных антипсихотиков. Полиморфные варианты гена *HTR2A* (rs6311 (-1438 A>G) и rs6313 (102 T>C)), потенциально связанные с нарушением эффективности пост-транскрипционных процессов, рассматриваются как факторы риска нейropsychических и когнитивных патологий. В настоящем исследовании мы провели генотипирование указанных аллельных вариантов среди пациентов с расстройствами шизофренического спектра на фоне антипсихотической терапии (галоперидолом или оланзапином) (n = 60) и в контрольной группе (n = 106). Обнаружено высокое неравновесное сцепление аллельных вариантов rs6311 и rs6313 (D' = 0.98), достоверных различий между распределением генотипов группы контроля и пациентов с расстройствами шизофренического спектра не обнаружено. Показан вклад носительства гомозиготного генотипа GG (CC) в эффективность терапии галоперидолом (p = 0.048). Впервые оценено влияние однонуклеотидных полиморфных вариантов rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* на уровень мРНК гена и количество 5-HTR_{2A} у психически больных на фоне антипсихотической терапии. До начала терапии уровень мРНК гена *HTR2A* между генотипами не различался, тогда как количество белка 5-HTR_{2A} было достоверно выше у носителей генотипа AA (TT) (p = 0.004). На фоне терапии галоперидолом у носителей генотипа GG (CC) происходило увеличение экспрессии гена *HTR2A* (p = 0.034). Терапия оланзапином приводила к снижению количества 5-HTR_{2A} у носителей аллеля дикого типа «А», по всей видимости за счет фармакологического действия препарата. Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать, что антипсихотические препараты независимо от аффинитета их действия модулируют транскрипцию и (или) трансляцию гена *HTR2A* генотип rs6311 (rs6313) зависимым образом и могут влиять на эффективность терапии.

Ключевые слова: расстройства шизофренического спектра, антипсихотическая терапия, рецептор серотонина 2А, ген *HTR2A*, лейкоциты периферической крови.

Принятые сокращения: 5-HTR_{2A} — рецептор 5-гидрокситрипamina (серотонина) 2А, МКБ — международная классификация болезней, мРНК — матричная РНК, ОНП — однонуклеотидный полиморфный вариант, ПДРФ — полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) — шкала оценки позитивных и негативных синдромов.

Серотонин (5-гидрокситрипамин) является одним из ключевых соединений, определяющих биологические функции и поведение человека, играющих важное значение в патогенезе широкого спектра расстройств — психических, неврологических, кардиоваскулярных и желудочно-кишечного тракта. Роль медиатора поддержания гомеостаза организма серотонин выполняет в основном через

рецепторы, экспрессирующиеся на клеточной поверхности эффекторных клеток, как нейронов центральной и вегетативной нервной системы, так и иммунных клеток и энтерохромаффинных клеток желудка и кишечника. Известно семь типов рецепторов серотонина: наибольшее внимание исследователей сосредоточено на рецепторе 2А (5-HTR_{2A}), задействованном во многих функциях орга-

низма (Myers et al., 2007; Serretti et al., 2007; Smith et al., 2013, 2014; Ruble et al., 2016).

5-HTR_{2A} был открыт Притчеттом в 1988 г. (Pritchett et al., 1988), принадлежит к семейству рецепторов, связанных с G-белками (G protein-coupled receptor, GPCR). Ген *HTR2A*, кодирующий данный рецептор, клонирован первым из генов рецепторов серотонина и картирован на хромосоме 13q14.2. Однонуклеотидные полиморфные варианты (ОМП) *HTR2A* являются факторами риска развития множества патологий, преимущественно затрагивающих нейropsychические, в том числе когнитивные, функции организма человека с высокой вариабельностью пенетрантности для различных фенотипов. Наиболее широко изучаемые ОМП *HTR2A* — rs6311 (-1438 A>G) и rs6313 (102 T>C) — находятся в неравновесном сцеплении, сила которого имеет популяционные различия. Несмотря на то что полиморфный вариант rs6313 локализован в 1-м экзоне, он не влияет на аминокислотную последовательность белка (оба аллеля кодируют серин в 34-м кодоне) и, как ОМП rs6311, расположенный в 5'-нестранслируемой области в непосредственной близости от промоторного региона гена, ассоциирован с изменением экспрессии. В настоящее время результаты ассоциативных исследований генотипов rs6311 (rs6313) с уровнем мРНК или количеством белка 5-HTR_{2A} носят противоречивый характер. Авторы объясняют это воздействием окружающих факторов, возможно самостоятельно влияющих на транскрипцию гена и процессинг белка (Myers et al., 2007; Serretti et al., 2007; Smith et al., 2013, 2014), а также тканеспецифичным характером модулирования экспрессии *HTR2A* (Fukuda et al., 2006).

Расстройств шизофренического спектра являются наиболее превалирующими и серьезными психическими нарушениями, характеризуются хроническим течением и нуждаются в обязательной антипсихотической терапии (Lopez, Murray, 1998). 5-HTR_{2A} является мишенью действия атипичных антипсихотиков и антидепрессантов. Несмотря на многочисленные исследования, посвященные изучению модулирования серотонинергической нейротрансмиссии лекарственными препаратами, влияние аллельных вариантов гена *HTR2A* на функциональную активность и экспрессию 5-HTR_{2A} при приеме антипсихотических препаратов остается до конца неясным (Serretti et al., 2007; Moore et al., 2014; Pouget, Muller, 2014).

В связи с ограничениями исследования тканей мозга лейкоциты периферической крови в настоящее время рассматривают как удобную суррогатную модель для изучения нейродегенеративных и психических патологий (Rollins et al., 2010; Fernandez-Egea et al., 2016; Levite, 2016). Так как данный тип иммунных клеток экспрессирует на своей клеточной мембране 5-HTR_{2A} и подвержен системному действию антипсихотических препаратов, он может быть рассмотрен как адекватный инструмент оценки функционального значения генетических вариантов *HTR2A* и монитора фармакокоррекции психически больных.

Цель настоящего исследования — изучение влияния ОМП rs6311 (-1438 A>G) и rs6313 (102 T>C) на уровень мРНК гена и количество белка HTR_{2A} на мононуклеарных лейкоцитах периферической крови на фоне антипсихотической терапии пациентов с расстройствами шизофренического спектра. Мы предполагаем, что изучаемые ОМП могут влиять на действие антипсихотиков и играть роль в эффективности проводимой терапии.

Материал и методика

Характеристика исследуемых групп. В исследование было включено 60 пациентов (средний возраст 28 ± 7 лет) с первым психотическим эпизодом расстройств шизофренического спектра. Диагноз устанавливался согласно критериям F2 МКБ-10. Критериями включения были европеоидная раса, мужской пол и подписание информированного согласия пациентом. Критериями исключения — прием антипсихотических препаратов в анамнезе и коморбидное течение психического расстройства. Пациенты в период обследования находились на стационарном лечении в отделении первого психотического эпизода СПб. ГБУЗ им. П. П. Кашенко с июня 2014 по апрель 2016 г. Работа с пациентами была проведена в соответствии с этическими положениями Хельсинкской декларации и Национальным стандартом Российской Федерации «Надлежащая клиническая практика» ГОСТ Р 52379-2005.

Путем рандомизации исследуемые пациенты были отнесены к одной из двух групп терапии: галоперидол — антипсихотик I генерации с высоким аффинитетом к рецепторам дофамина ($n = 30$) и оланзапин — атипичный антипсихотик, обладающий тропностью к широкому спектру рецепторов, с наибольшим сродством и активностью к 5-HTR_{2A} ($n = 30$). Препараты назначали в режиме монотерапии. Суточная доза препарата для пациентов с терапией оланзапином составила 18.5 ± 3.9 мг/день, галоперидолом — 19.8 ± 5.6 мг/день. Статистически значимых различий в демографических характеристиках между группами, различными по фармакотерапии, не обнаружено ($p = 0.166$, непарный Т-тест Стьюдента, с двумя степенями свободы).

Психометрическую оценку состояния психически больных проводили с использованием стандартизированной шкалы оценки позитивных и негативных синдромов — PANSS (Positive and Negative Syndrome Scale) — и ее подшкал, характеризующих позитивные нарушения, негативные нарушения, общепсихотические симптомы и симптомы подшкалы тревога—депрессия (Kay et al., 1987; Lindenmayer et al., 1995).

Контрольная группа, используемая для оценки неравновесия по сцеплению rs6311 и rs6313 и ассоциации ОМП с развитием расстройств шизофренического спектра, включала в себя 106 здоровых добровольцев, не состоящих на учете у психиатра, отрицающих психические и неврологические хронические заболевания, с сопоставимыми характеристиками по возрасту и полу.

Материалом для исследования служила периферическая кровь (10 мл), взятая из локтевой вены в вакуумные пробирки с 0.5 М ЭДТА (рН 8.0) в качестве антикоагулянта. Исследование у пациентов с расстройствами шизофренического спектра проводили дважды — до начала и на 28-е сут антипсихотической терапии.

Выделение мононуклеарных лейкоцитов периферической крови осуществляли методом градиентного центрифугирования. Венозную кровь разводили в 2 раза однократным раствором DPBS (Биолот, Россия) и наслаивали на градиент плотности фиколла Ficoll-Paque PLUS ($d = 1.077$) (GE Healthcare Biosciences, США) в соотношении 1 : 2 и центрифугировали при 300 g в течение 20 мин. Образовавшееся интерфазное кольцо из мононуклеарных клеток осторожно через верхний слой плазмы собирали пипеткой, дважды отмывали раствором DPBS (Биолот, Россия), последовательно ресуспендируя и центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 300 g.

Т а б л и ц а 1

Детализация методики анализа ОНП

ОНП	Последовательность праймеров (5'-3')	Литературный источник	Температура, °С	MgCl ₂ , мМ	Эндонуклеаза	Размер продукта реакции, п. о.
rs6311-1438 A>G	For: agctgcaaggtagcaacacagc Rev: aaccaacttattcctaccac	Nomura et al., 2006	58	1.5	MspI	A = 468 G = 244+224
rs6313 102 T>C	For: aactacgaactccctaa Rev: gtatgtttccagcaat	Gong et al., 2015	56	2.5	»	T = 242 C = 63+179

Идентификацию ОНП rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* проводили методом анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ), детализация методики представлена в табл. 1. В качестве матрицы реакции использовали 25 нг геномной ДНК, выделенной из лейкоцитов периферической крови солевым методом (Miller et al., 1988). Амплификацию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ сульфата аммония, 0.1 % Triton X-100, соответствующую концентрацию MgCl₂ (Thermo Scientific, США), 2.5 мМ каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 25 пМ прямого (For) и обратного (Rev) праймеров (Синтол, Россия) и 1 МЕ Taq ДНК-полимеразы (Биосан, Россия). Для амплификации фрагмента с rs6311 в реакционную смесь добавляли 0.5 мкл 100 % диметилсульфоксида (DMSO) (Amresco, США). Условия амплификации: начальная денатурация 3 мин при 95 °С; 36 циклов по 30 с при 95 °С — 30 с, 30 с при соответствующей температуре отжига, 30 с при 72 °С; заключительный синтез при 72 °С в течение 5 мин.

Эндонуклеазное расщепление 5 мкл ПЦР продукта проводили с использованием 5 МЕ фермента рестрикции Msp I (Thermo Scientific, США) при 37 °С в течение 3 ч в однократном буфере Tango (Thermo Scientific, США). Анализ ПДРФ проводили путем электрофоретического разделения в 6%-ном полиакриламидном геле в присутствии маркера молекулярной массы (Thermo Scientific, США) с последующей окраской бромистым этидием и визуализацией в УФ-свете.

Оценка уровня мРНК гена *HTR2A*. Выделение тотальной РНК из мононуклеарных лейкоцитов осуществляли сорбентно-колоночным методом (RNeasy Mini Kit, QIAGEN, Германия), кДНК получали методом обратной транскрипции с использованием набора Reverd Aid First cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, США) согласно инструкции фирмы-производителя.

Определение уровня мРНК гена *HTR2A* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием флуорогенного зонда TaqMan на приборе CFX96 Touch (BioRad, США). Эндогенным контролем служил конститутивно экспрессирующийся в клетках ген *GNB2L1* (guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like). Дизайн праймеров и пробы для гена *HTR2A* взят из литературного источника (Smith et al., 2013) — For: 5'-GCAAGATGCCAAGACAACAGATAA-3', Rev: 5'-TCACACACAGCTCACSTTTTCAT-3', проба TaqMan: FAM-TGGTTGCTCTAGGAAAGCAG-RTQ1; для гена *GNB2L1* разработан нами самостоятельно с помощью программы Primer Express™ (Applied Biosystems) — For: 5'-GAATACCSTGGGTGTGTGCAA-3', Rev: 5'-GGACACAAGACACCCACTCTGA-3', проба TaqMan: HEX-TACACTGTCCAG GATGAGA-BHQ2.

Амплификацию каждого образца проводили в трех повторях в 50 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Triton X-100, 2.0 мМ MgCl₂ (Thermo Scientific, США), 2.5 мМ каждого dNTP (Thermo Scientific, США), по 15 пМ каждого праймера и 25 пМ флуорогенного зонда, 5 МЕ термостабильной Taq ДНК-полимеразы (Биосан, Россия) и 1 мкг кДНК, в 96-луночных планшетах при температурном режиме: 94 °С в течение 15 с и 60 °С в течение 60 с, 45 циклов. Оценка относительного уровня мРНК гена *HTR2A* проводили с использованием метода относительных измерений 2^{-ΔΔCt}.

Определение количества белка 5-HTR_{2A} в лейкоцитах периферической крови проводили методом иммуноферментного анализа с использованием набора ELISA kit for 5-Hydroxytryptamine Receptor 2A (HTR2A) (Cloud-Clone Corp, США). Клетки лизировали в буфере, содержащем 1 % Triton X-100, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % SDS, 150 мМ NaCl, 50 мМ Tris (pH 8.0) и 1 % смеси ингибиторов протеаз (#P8340, Sigma-Aldrich, Германия), в течение 20—30 мин на льду. Измерение общего белка в клеточных лизатах проводили с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США). Количественное определение белка 5-HTR_{2A} осуществляли в 20 мг общей белковой фракции лейкоцитов. Исследование каждого образца проводили в двух повторях. Оптическую плотность оценивали на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, USA). Результаты представлены в нг/мг.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программы SPSS версия 21.0 (IBM, США). Определение соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов равновесию Харди—Вайнберга в изучаемых группах проводили с помощью точного теста Фишера. Сравнение распределения генотипов между группами выполняли с использованием критерия χ². Оценку неравновесия по сцеплению ОНП rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* (коэффициент сцепления D', коэффициент корреляции r²) проводили с использованием программного обеспечения Haploview (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>). Для проверки статистических гипотез о виде распределения данных использовали W-тест Шапиро—Уилка. Так как изучаемые переменные (количество мРНК и белка) имели существенное отклонение от нормального распределения, сравнение показателей проводили при помощи непараметрических критериев: между группами, различающимися по фармакотерапии, — критерия Манна—Уитни, между визитами внутри исследуемой группы — критерия Фридмана для повторных измерений; корреляционные зависимости оценивали с помощью

Таблица 2

Частота генотипов rs6311 и rs6313 гена у пациентов с расстройствами шизофренического спектра и в контрольной группе^a

ОНП гена <i>HTR2A</i>	Генотипы	Пациенты с расстройствами шизофренического спектра, n = 60	Контроль, n = 106	Статистические показатели
rs6311-1438 A>G	AA	12 (0.20)	20 (0.19)	$\chi^2 = 0.004$, $p = 0.998$
	AG	26 (0.43)	48 (0.45)	
	GG	22 (0.37)	38 (0.36)	
rs6313 102 T>C	TT	13 (0.22)	18 (0.17)	$\chi^2 = 0.892$, $p = 0.640$
	TC	26 (0.43)	49 (0.46)	
	CC	21 (0.35)	39 (0.37)	

Примечание. ^a Данные представлены в форме n (частота).

критерия корреляции Спирмена. Уровень значимости для всех использованных критериев — $p < 0.05$. Показатели среднего представлены в виде медианы и нижнего и верхнего квартилей ($Lq \div Hq$).

Используемые реактивы: раствор DPBS (Биолот, Россия), Taq ДНК-полимераза (Биосан, Россия), $MgCl_2$ (Thermo Scientific, США), смесь dNTP (Thermo Scientific, США), диметилсульфоксид (DMSO) (Amresco, США), эндонуклеаза рестрикции Msp I (Thermo Scientific, США), олигонуклеотидные праймеры для ПЦР (Синтол, Россия), фиколл Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, США), RNeasy MiniKit (Qiagen, США), Revert Aid First cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, США), смесь ингибиторов протеаз (Sigma-Aldrich, Германия), ELISA kit for 5-Hydroxytryptamine Receptor 2A (*HTR2A*) (Cloud-Clone Corp., США), Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, США).

Результаты

Распределение генотипов по rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* в исследуемых выборках соответствовало равновесию Харди—Вайнберга. Достоверных различий в частоте встречаемости носителей генотипов между группой пациентов с расстройствами шизофренического спектра и индивидуумов группы контроля обнаружено не было, данные представлены в табл. 2. Анализ сцепления ОНП rs6311 и rs6313 подтвердил показанную ранее другими

авторами (Spurlock et al., 1993; Serretti et al., 2007; Smith et al., 2013) высокую степень неравновесия по сцеплению: для лиц из группы контроля показатель неравновесности D' составил 0.98 ($r^2 = 0.89$), группы психически больных — 0.92 ($r^2 = 0.7$). Поскольку анализируемые ОНП для пациентов с расстройствами шизофренического спектра показали высокую величину неравновесной связи, ниже представлены данные только для rs6311.

По результатам психометрического обследования на фоне фармакотерапии пациенты с расстройствами шизофренического спектра были разделены на группы по эффективности применяемой терапии. При уменьшении количества баллов, набранных по суммарной шкале PANSS, не менее чем на 20 % за 28 сут терапии (что соответствует клинически значимой положительной динамике психического состояния), пациентов относили в группу эффективной терапии; при снижении количества баллов менее чем на 20 % от начального показателя — в группу малоэффективной терапии. Эффективность терапии галоперидолом ассоциировалась с носительством гомозиготного генотипа GG rs6311, данные представлены в табл. 3. Достоверных различий в распределении генотипов в подгруппах по динамике психического состояния при терапии оланзапином не наблюдали.

Динамика изменения относительного уровня мРНК гена *HTR2A* на фоне антипсихотической терапии в лейкоцитах периферической крови представлена на рис. 1, а. Уровень экспрессии *HTR2A* перед началом терапии составил 2.76 (0.43 ÷ 9.19). При терапии галоперидолом на-

Таблица 3

Распределение генотипов rs6311 в подгруппах пациентов с расстройствами шизофренического спектра по эффективности антипсихотической терапии

Генотипы rs6311 гена <i>HTR2A</i>	Терапия галоперидолом		Терапия оланзапином	
	уменьшение числа баллов по шкале PANSS		уменьшение числа баллов по шкале PANSS	
	≥ 20 % (n = 17)	< 20 % (n = 13)	≥ 20 % (n = 18)	< 20 % (n = 12)
AA+AG n (частота)	7 (0.41)	11 (0.85)	13 (0.72)	7 (0.58)
GG n (частота)	10 (0.59)	2 (0.15)	5 (0.28)	5 (0.42)
Статистические показатели	$\chi^2 = 3.913$, $p = 0.048$ OR = 0.141, 95 % CI (0.023—0.857)		$\chi^2 = 0.625$, $p = 0.429$	

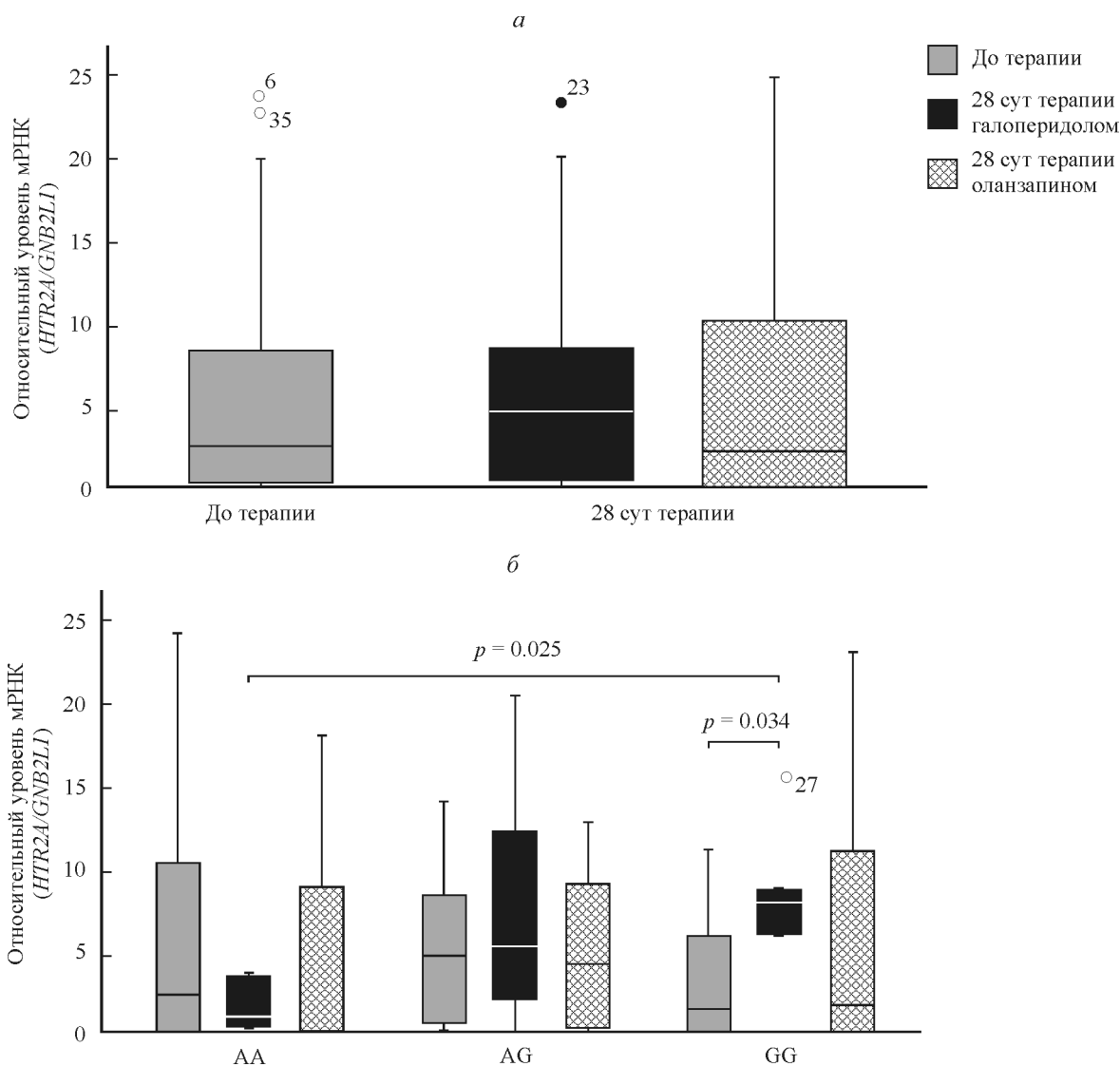


Рис. 1. Относительный уровень мРНК гена *HTR2A* (*HTR2A/GNB2L1*) в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови у пациентов с расстройствами шизофренического спектра на фоне антипсихотической терапии галоперидолом или оланзапином (до терапии и на 28-е сут терапии).

а — общая группа пациентов, *б* — деление на подгруппы в зависимости от носительства генотипов rs6311 (A-1438G) гена *HTR2A* — AA, AG и GG.

блюдали тенденцию к увеличению относительного уровня мРНК гена *HTR2A* (без статистически достоверных различий), который на 28-е сут фармакокоррекции составил 5.68 (0.65÷13.38), тогда как терапия оланзапином практически не влияла на уровень экспрессии гена, и его показатели составляли 2.62 (0.17÷11.7).

При изучении количества белка 5-HTR_{2A} у пациентов с расстройствами шизофренического спектра в мононуклеарных клетках периферической крови показано достоверное снижение данного показателя при терапии оланзапином ($p < 0.001$) (рис. 2, *а*). Начальная концентрация белка в лейкоцитарной массе у психически больных в актуальном состоянии составляла 7.82 нг/мг (5.16÷10.00) и снижалась до 3.99 нг/мг (2.30÷6.39) на 28-е сут фармакотерапии оланзапином — препаратом, обладающим высоким аффинитетом к изучаемому рецептору нейротрансмиссии, в то время как терапия галоперидолом практически не влияла на количество 5-HTR_{2A} (6.52 нг/мг (5.05÷7.65)).

Изучаемые показатели, уровень мРНК гена *HTR2A* и количество кодируемого этим геном рецепторного белка до начала терапии антипсихотическими препаратами положительно линейно коррелировали ($r = 0.356$) при уровне достоверности 0.008. На 28-е сут терапии оланзапином корреляционная зависимость усиливалась ($r = 0.606$, $p = 0.001$), а при терапии галоперидолом взаимосвязь утрачивалась ($r = 0.270$, $p = 0.224$).

В ходе работы мы оценили влияние ОНП rs6311 и rs6313 гена *HTR2A* на относительный уровень мРНК *HTR2A* и количество 5-HTR_{2A} у пациентов с расстройствами шизофренического спектра на фоне антипсихотической терапии. В стадии острого психоза (до начала терапии) уровень мРНК достоверно не различался у носителей различных генотипов ОНП rs6311 и rs6313, тогда как количество соответствующего белка было достоверно выше у носителей генотипа AA по сравнению с альтернативным гомозиготным вариантом GG ($p = 0.004$) (рис. 1, *б*; 2, *б*).

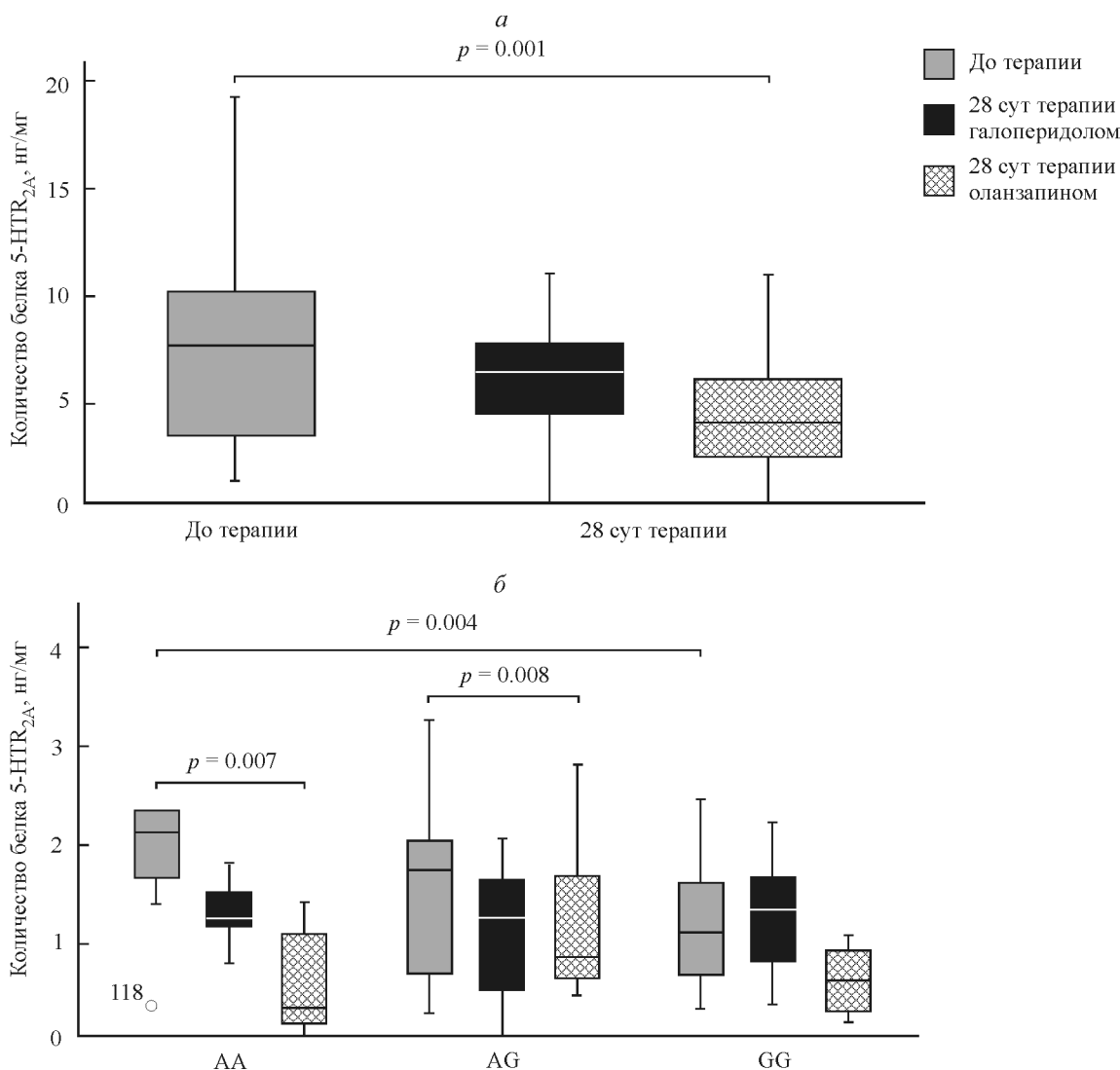


Рис. 2. Количество белка рецептора 5-НТ_{2А} в мононуклеарных лейкоцитах периферической крови (нг/мг) у пациентов с расстройствами шизофренического спектра на фоне антипсихотической терапии галоперидолом или оланзапином (до терапии и на 28-е сут терапии).

а — общая группа пациентов, б — деление на подгруппы в зависимости от носительства генотипов rs6311 (A-1438G) гена *HTR2A* — AA, AG и GG.

На фоне антипсихотической терапии (28 сут) изменение уровня мРНК гена и белка 5-НТ_{2А} носило генотипзависимый характер (рис. 1, б; 2, б). Тенденция к повышению относительного уровня мРНК на фоне терапии галоперидолом в общей группе пациентов с психическими расстройствами ассоциировалась с гомозиготным носительством аллеля G. Уровень экспрессии гена при носительстве генопипа GG был достоверно выше по сравнению как с данным показателем носителей генотипа AA ($p = 0.025$), так и с изначальным уровнем экспрессии гена при генотипе GG ($p = 0.034$). Уменьшение количества белка при антипсихотической терапии оланзапином, возможно связанное с фармакологическим действием препарата, ассоциировалось с носительством аллеля А (генотипы AA и AG, $p = 0.007$ и $p = 0.008$ соответственно).

Обсуждение

Томографические методы исследования показали, что развитие острых психотических состояний сопровождается аномальным распределением 5-НТ_{2А} рецепторов в различных отделах головного мозга — уменьшением плотности в префронтальной коре и коре височной доли больших полушарий, что связывают с развитием негативной симптоматики заболеваний и нарушением регуляции дофаминергической нейротрансмиссии (Selvaraj et al., 2014). Многочисленные исследования возможной ассоциации полиморфных вариантов rs6311 (rs6313) гена *HTR2A* с риском развития шизофрении дали противоречивые результаты, различающиеся даже в рамках одной и той же этнической популяции (Serretti et al., 2007). Примерно только в половине исследований показано, что увеличение риска расстройства ассоциировано с носительством аллеля C(G) (Gu et al., 2013; Yildiz et al., 2013; Sujitha et al., 2014), вовлеченным в процессы изменения

транскрипционной активности гена, что приводит к снижению количества белка и потенциала связывания рецептора. В нашей работе, как и ряде других работ, статистически значимых доказательств вовлечения ОНП rs6311 (rs6313) в патогенез расстройств шизофренического спектра получено не было. Мы предполагаем, что изучаемые аллельные варианты гена *HTR2A* в большей степени определяют доминирование тех или иных симптомов расстройства (позитивных, негативных, общих психопатологических) и особенности ответа организма на антипсихотическую терапию.

HTR2A входит в десятку наиболее изучаемых генов в фармакогенетических исследованиях фармакодинамики антипсихотических препаратов (Pouget, Muller, 2014). Ранее было показано, что ОНП гена *HTR2A*, приводящие к аминокислотным заменам T25Y, I197V, A447V и H452Y, могут в условиях *in vitro* модулировать фармакологическое действие ряда атипичных антипсихотиков и селективных агонистов 5-HTR_{2A} и формировать индивидуальную чувствительность к данным фармпрепаратам (Davies et al., 2006). Было показано, что фенотипические проявления генетических маркеров имеют межэтнические различия и зависят от аффинитета препарата терапии (Anttila et al., 2007; Serretti et al., 2007). Влияние аллельных вариантов rs6311 (rs6313) на эффективность терапии галоперидолом, обнаруженное в нашем исследовании, согласуется с литературными данными: носительство генотипов AA (TT) ассоциировано с плохим ответом на препарат, тогда как генотипы GG (CC) связаны с положительной динамикой психического состояния, причем данные результаты получены только для пациентов европейского происхождения (Benmessaoud et al., 2008). В исследованиях некоторых авторов наблюдается противоречие результатов фармакогенетических ассоциативных исследований, показывающих полное неравновесие по сцеплению между ОНП rs6311 и rs6313. Полиморфный вариант rs6313 ассоциирован с эффективностью терапии галоперидолом, в то время как для ОНП rs6311 подобной ассоциации не наблюдается (Vehof et al., 2012; Гареева и др., 2015). Данный факт можно объяснить, по всей видимости, межпопуляционными различиями в степени неравновесия связи ОНП.

В настоящем исследовании нами впервые охарактеризованы количество белка 5-HTR_{2A} и уровень мРНК гена, кодирующего данный рецептор, в лейкоцитах периферической крови у пациентов с первым эпизодом расстройств шизофренического спектра на фоне антипсихотической терапии в зависимости от генотипов ОНП rs6311 (rs6313) *HTR2A*. В остром периоде расстройства, до начала антипсихотической терапии, показано достоверное увеличение белка 5-HTR_{2A}, ассоциированное с носительством аллеля А, при этом уровень мРНК между генотипами не имел статистически значимых различий. Несмотря на противоречивые результаты исследований влияния изучаемых ОНП на функциональную активность гена, по мировым данным, аллели дикого типа А rs6311 и Т rs6313 сопряжены с более высокой промоторной активностью по сравнению с аллелями G и C соответственно. При изучении механизмов влияния данных ОНП на работу гена *HTR2A* было показано, что замена rs6311 влияет на выбор альтернативного сайта начала транскрипции, ассоциированного с более длинным 5'UTR-регионом и увеличением эффективности трансляции белка (Smith et al., 2013), а rs6313 влияет на вторичную структуру транскрипта, его стабильность и трансляционную актив-

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

В данной работе показано, что зависимость от генотипа rs6311 (rs6313) увеличение количества белка реализуется при остром психическом состоянии, характеризующемся дисбалансом нейроиммунного гомеостаза.

При антипсихотической терапии, приводящей к нормализации психического состояния, были зарегистрированы изменения уровня мРНК *HTR2A* и количества белка 5-HTR_{2A} в зависимости от аллельного варианта rs6311 (rs6313) и препарата терапии. По результатам нашей работы видно, что на фоне терапии галоперидолом — препаратом с низким аффинитетом к изучаемому рецептору — происходило увеличение экспрессии гена *HTR2A*, ассоциированное с носительством гомозиготного «мутантного» генотипа типа GG, не сопровождающееся изменением количества белка на лейкоцитах.

Влияние галоперидола — антагониста дофаминовых рецепторов — на экспрессию гена рецептора серотонина можно объяснить опосредованным механизмом действия. Ранее было показано, что, с одной стороны, галоперидол угнетает систему вознаграждения, блокируя рецепторы дофамина, с другой — увеличивает уровень серотонина в префронтальной коре головного мозга, что рассматривают как компенсаторный механизм регуляции дофаминовых рецепторов (Benaliouad et al., 2006; Charron et al., 2015).

Несмотря на то что тела дофаминергических, норадренергических и серотонинергических нейронов в ЦНС локализованы в дискретных ядрах, их проекции на передний мозг создают комплексные сети перекрывающихся иннерваций, образуя общую моноаминергическую систему, модулирующую высшие психические процессы. Существует взаимная иннервация между различными типами моноаминергических нейронов, обеспечивающая их тесные функциональные взаимодействия (Hensler et al., 2013): доказана ключевая роль 5-HTR_{2A} в стабилизации и (или) модуляции дофаминергической нейротрансмиссии в мезокортикальных и мезолимбических путях (Masana et al., 2012).

Можно предположить, что в периферическом русле крови происходят подобные взаимодействия между моноаминами через эффекторные рецепторы, расположенные на мононуклеарных клетках, формируется единая взаимно регулируемая сеть моноаминного гомеостаза. При опосредованной галоперидолом блокировке работы рецепторов дофамина запускается их активизация через рецепторы 5-HT_{2A}, усиливается экспрессия *HTR2A*, причем генотипзависимым образом. Так как генотип GG ассоциирован с пониженной эффективностью трансляции (процессингом белка), повышение уровня экспрессии гена не влияет на уровень белка на лейкоцитарных клетках. И по всей видимости, ассоциация ОНП rs6311 (rs6313) гена *HTR2A* с эффективностью терапии галоперидолом связана с генотипзависимым повышением экспрессии гена *HTR2A* на фоне действия данного препарата.

Снижение уровня белка 5-HTR_{2A} на фоне действия оланзапина объясняется, вероятно, его фармакологическим действием. Причем происходит оно только у носителей аллельного варианта А, ассоциированного с повы-

шенной трансляционной активностью, которая, возможно, снижается при действии препарата.

Подобные результаты получены впервые. Исследования влияния ОНП rs6311 (rs6313) гена *HTR2A* на процессы реализации генетической информации (уровень мРНК и белка) на фоне антипсихотической терапии ранее в мировой практике не проводилось.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предполагать, что антипсихотические препараты независимо от их фармакодинамики модулируют транскрипцию и (или) трансляцию гена *HTR2A* генотип rs6311 (rs6313) зависимым образом, что может определять эффективность терапии. Для понимания механизма действия антипсихотиков на уровне мРНК гена *HTR2A* и белка 5-HT_{2A} в периферическом русле крови необходимо проведение дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00904).

Список литературы

- Гарева А. Э., Киняшева К. О., Галактионова Д. Ю., Сабиров Э. Т., Валинуров Р. Г., Чудинов А. В., Заседателев А. С., Наседкина Т. В., Хуснутдинова Э. К. 2015. Полиморфизм генов нейромедиаторных систем мозга: поиск фармакогенетических маркеров эффективности галоперидола у русских и татар. Молекуляр. биол. 49 (6) : 959—967. (Gareeva A. E., Kinyasheva K. O., Galaktionova D. Yu., Sabirov E. T., Valinurov R. G., Chudinov A. V., Zasedatelev A. S., Nasedkina T. V., Khusnutdinova E. K. 2015. Polymorphism of brain neurotransmitter system genes: search for pharmacogenetic markers of haloperidol efficiency in Russians and Tatars. Mol. Biol. 49 (6) : 959—967.)
- Anttila S., Kampman O., Illi A., Rontu R., Lehtimäki T., Leinonen E. 2007. Association between 5-HT_{2A}, TPH1 and GNB3 genotypes and response to typical neuroleptics: a serotonergic approach. BMC Psychiatry. 7 : 22.
- Benaliouad F., Kapur S., Rompre P. P. 2007. Blockade of 5-HT_{2a} receptors reduces haloperidol-induced attenuation of reward. Neuropsychopharmacology. 32 (3) : 551—561.
- Bemessaoud D., Hamdani N., Boni C., Ramoz N., Hamon M., Kacha F., Gorwood P. 2008. Excess of transmission of the G allele of the -1438A/G polymorphism of the 5-HT_{2A} receptor gene in patients with schizophrenia responsive to antipsychotics. BMC Psychiatry. 8 : 40.
- Charron A., Hage C. E., Servonnet A., Samaha A. N. 2015. 5-HT₂ receptors modulate the expression of antipsychotic-induced dopamine supersensitivity. Eur. Neuropsychopharmacol. 25 : 2381—2393.
- Davies M. A., Setola V., Strachan R. T., Sheffler D. J., Salay E., Hufeisen S. J., Roth B. L. 2006. Pharmacologic analysis of non-synonymous coding h5-HT_{2A} SNPs reveals alterations in atypical antipsychotic and agonist efficacies. Pharmacogenomics J. 6 : 42—51.
- Fernandez-Egea E., Vertes P. E., Flint S. M., Turner L., Mustafa S., Hatton A., Smith K. G. C., Lyons P. A., Bullmore E. T. 2016. Peripheral immune cell populations associated with cognitive deficits and negative symptoms of treatment-resistant schizophrenia. PLoS ONE. 11 : e0155631.
- Fukuda Y., Koga M., Arai M., Noguchi E., Ohtsuki T., Horiuchi Y., Ishiguro H., Niizato K., Iritani S., Itokawa M., Arinami T. 2006. Monoallelic and unequal allelic expression of the *HTR2A* gene in human brain and peripheral lymphocytes. Biol. Psychiatry. 60 : 1331—1335.
- Gong P., Liu J., Blue P. R., Li S., Zhou X. 2015. Serotonin receptor gene (*HTR2A*) T102C polymorphism modulates individuals' perspective taking ability and autistic-like traits. Front. Hum. Neurosci. 9 : 1—8.
- Gu L., Long J., Yan Y., Chen Q., Pan R., Xie X., Mao X., Hu X., Wei B., Su L. 2013. HTR2A 1438A/G polymorphism influences the risk of schizophrenia but not bipolar disorder or major depressive disorder: a meta-analysis. J. Neurosci. Res. 91 : 623—633.
- Hensler J. G., Artigas F., Bortolozzi A., Daws L. C., De Duraerdere P., Milan L., Navailles S., Koek W. 2013. Catecholamine/serotonin interactions: systems thinking for brain function and disease. Adv. Pharmacol. 68 : 167—197.
- Kay S. R., Fiszbein A., Opler L. A. 1987. The positive and negative syndrome scale (panss) for schizophrenia. Schizophr. Bull. 13 : 261.
- Levite M. 2016. Dopamine and T cells: dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases. Acta Physiol. 216 : 42—89.
- Lindenmayer J. P., Grochowski S., Hyman R. B. 1995. Five factor model of schizophrenia: replication across samples. Schizophr. Res. 14 : 229—234.
- Lopez A. D., Murray C. C. 1998. The global burden of disease, 1990—2020. Nat. Med. 4 : 1241—1243.
- Masana M., Santana N., Artigas F., Bortolozzi A. 2012. Dopamine neurotransmission and atypical antipsychotics in prefrontal cortex: a critical review. Curr. Topics Med. Chem. 12 : 2357—2374.
- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids. 16 : 12—15.
- Moore T. R., Hill A. M., Panguluri S. K. 2014. Pharmacogenomics in psychiatry: implications for practice. Recent Patents on Biotechnology. 8 : 152—159.
- Myers R. L., Airey D. C., Hal Manier D., Shelton R. C., Sanders-Bush E. 2007. Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (*HTR2A*) influence gene expression. Biol. Psychiatry. 61 : 167—173.
- Nomura M., Kusumi I., Kaneko M., Masui T., Daiguji M., Ueno T., Koyama T., Nomura Y. 2006. Involvement of a polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor gene in impulsive behavior. Psychopharmacology. 187 : 30—35.
- Pouget J. G., Muller D. J. 2014. Pharmacogenetics of antipsychotic treatment in schizophrenia. In: Pharmacogenomics in drug discovery and development. Methods in Molecular Biology (Qing Yan ed.). Chapter 14. New York: Springer Science+Business Media. 557—587.
- Pritchett D. B., Bach A. W., Wozny M., Taleb O., Dal Toso R., Shih J. C., Seeburg P. H. 1988. Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. EMBO J. 7 : 4135—4140.
- Rollins B., Martin M. V., Morgan L., Vawter M. P. 2010. Analysis of whole genome biomarker expression in blood and brain. Amer. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 153B : 919—936.
- Ruble C. L., Smith R. M., Calley J., Munsie L., Airey D. C., Gao Y., Shin J. H., Hyde T. M., Straub R. E., Weinberger D. R., Nisenbaum L. K. 2016. Genomic structure and expression of the human serotonin 2A receptor gene (*HTR2A*) locus: identification of novel *HTR2A* and antisense (*HTR2A-ASI*) exons. BMC Genetics. 17 : 16.
- Selvaraj S., Arnone D., Cappai A., Howes O. 2014. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. Neurosci. Biobehav. Rev. 45 : 233—245.
- Serretti A., Drago A., De Ronchi D. 2007. HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. Curr. Med. Chem. 14 : 2053—2069.
- Smith R. M., Banks W., Hansen E., Sadee W., Herman G. E. 2014. Family-based clinical associations and functional characterization of the serotonin 2A receptor gene (*HTR2A*) in Autism spectrum disorder. Autism Res. 7 : 459—467.
- Smith R. M., Papp A. C., Webb A., Ruble C. L., Munsie L. M., Nisenbaum L. K., Kleinman J. E., Lipska B. K., Sadee W. 2013. Multiple regulatory variants modulate expression of 5'-hydroxy-

tryptamine 2A receptors in human cortex. *Biol. Psychiatry*. 73 : 546—554.

Spurlock G., Heils A., Holmans P., Williams J., D'Souza U. M., Cardno A., Murphy K. C., Jones L., Buckland P. R., McGuffin P., Lesch K. P., Owen M. J. 1993. A family based associated study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter. *Mol. Psychiatry*. 3 : 42—49.

Sujitha S. P., Nair A., Banerjee M., Lakshmanan S., Harshavaradhan S., Gunasekaran S., Gopinathan A. 2014. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) 2A receptor gene polymorphism is associated with schizophrenia. *Indian J. Med. Res.* 140 : 736—743.

Vehof J., Burger H., Wilffert B., Hadithy A., Alizadeh B. Z., Snieder H. 2012. Clinical response to antipsychotic drug treatment: association study of polymorphisms in six candidate genes. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 22 : 625—631.

Yildiz S. H., Akilli A., Bagcioglu E., Ozdemir Erdogan M., Coskun K. S., Alpaslan A. H., Subasi B., Arıkan Terzi E. S. 2013. Association of schizophrenia with T102C (rs6313) and 1438 A/G (rs6311) polymorphisms of HTR2A gene. *Acta Neuropsychiatr.* 25 : 342—348.

Поступила 10 I 2018

SEROTONIN 2A RECEPTOR (*HTR2A*) GENE POLYMORPHISMS RS6311 AND RS6313
MODULATE mRNA AND PROTEIN EXPRESSION IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES
DURING ANTIPSYCHOTIC ADMINISTRATION

A. M. Zabolina,^{1,2,*} M. A. Belinskaya,¹ A. S. Zhuravlev,¹ R. F. Nasyrova,³ D. N. Sosin,³
E. E. Ershov,⁴ A. E. Taraskina,^{1—3} E. M. Krupitsky³

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad Region, 188300,

² I. P. Pavlov First S. Petersburg State Medical University, S. Petersburg, 197022,

³ V. M. Bekhterev National Medical Research Center Psychiatry and Neurology, S. Petersburg, 192019, and

⁴ S. Petersburg Psychiatric Hospital N 1 named after P. P. Kashchenko,

Leningrad Region, Gatchina district, v. Nikolskoe, 188357;

* e-mail: a.zabolina@gmail.com

5-hydroxytryptamine (serotonin) 2A receptor (5-HTR_{2A}) plays the key role in monoaminergic regulation of the human organism. It determines the biological functions and the behavior of a human, also being a target for atypical antipsychotics. Polymorphic variants of the gene *HTR2A* (rs6311 (-1438 A>G) и rs6313 (102 T>C)) are considered as risk factors for various pathologies, mainly affecting neuropsychiatric and cognitive functions, potentially associated with impaired efficiency of post-transcriptional processes and protein processing. In the current study, our research team genotyped the aforementioned allelic variants in group of patients with schizophrenic disorders treated by haloperidol or olanzapine (n = 60) and in control group of volunteers in the North-West region of Russia. Disequilibrium linkage of allelic variants rs6311 and rs6313 (D' = 0.98) has been detected, but there was not significant difference in the distribution of genotypes between the control group and the patients with schizophrenia. The contribution of the carrier of the homozygous genotype GG (CC) to the efficiency of therapy with haloperidol has been shown (p = 0.048). For the first time the effect of rs6311 and rs6313 of the *HTR2A* gene on the relative level of mRNA of the gene and the amount of 5-HTR_{2A} in mentally ill patients with antipsychotic therapy have been estimated. Before the treatment there were no differences in mRNA levels between the two groups, whereas the amount of the 5-HTR_{2A} protein was significantly higher in AA (TT) genotype carriers (p = 0.004). During haloperidol treatment mRNA level was increased in patients with GG (CC) genotype (p = 0.034). The therapy with olanzapine decreased the amount of the 5-HTR_{2A} protein in the group of patients with wild type allele A, likely due to the pharmacological effect of the drug. Thus, the data suggest that antipsychotic drugs regardless of their affinity, modulate the process of transcription and/or translation of the *HTR2A* gene in a genotype rs6311 (rs6313) dependent manner and might affect the efficiency of the therapy.

Key words: schizophrenic disorders, antipsychotic therapy, serotonin receptor 2A (5-HTR_{2A}), *HTR2A* gene, peripheral blood leukocytes.