

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈՒԷԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՂԱԶԱՐՅԱՆ ՀՈՎՍԵՓ ԿԱՐԱՊԵՏԻ

ԻՄՈՒՆԱՅԻՆ ՊԱՏԱՍԽԱՆԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉՆԵՐ ԵՎ ՄԻՋՆՈՐԴԱՆՑՈՒԹԵՐ
ԿՈՂԱՎՈՐՈՂ ԳԵՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՎԻՃԱԿԸ ՇԻՋՈՖՐԵՆԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ

Գ.00.03 – «Մոլեկուլային և բջջային կենսաբանություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության

ՄԵՂՍԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2014

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

КАЗАРЯН ОВСЕП КАРАПЕТОВИЧ

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ РЕГУЛЯТОРЫ И
МЕДИАТОРЫ ИММУННОГО ОТВЕТА, ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 03.00.03 – «Молекулярная и клеточная биология»

ЕРЕВАН – 2014

Ատենախոսության թեման հաստատել է ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գիտական խորհուրդը:

Գիտական ղեկավար՝ կենս. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր Ա.Ս. Բոյաջյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենս. գիտ. դոկտոր Գ.Գ. Հովհաննիսյան
բժշկ. գիտ. թեկնածու Ա.Ֆ. Մողոյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Հայ-Ռուսական (Սլավոնական) համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2014թ. հոկտեմբերի 24-ին,
ժամը 14⁰⁰-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում,
Փորձարարական կենսաբանության 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ,
0014, ք. Երևան, Հարաթյան փ. 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության
ինստիտուտի գրադարանում և <http://molbiol.sci.am> կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2014թ. սեպտեմբերի 24-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
կենս. գիտ. թեկնածու՝

Գ.Մ. Մկրտչյան



Тема диссертации утверждена ученым советом Института молекулярной биологии НАН РА

Научный руководитель: доктор биол. наук, профессор А.С. Бояджян

Официальные оппоненты: доктор биол. наук Г.Г. Оганесян
канд. мед. наук А.Ф. Согоян

Ведущая организация: Российско-Армянский (Славянский) университет.

Защита диссертации состоится 24 октября 2014г. в 14⁰⁰ часов на заседании
специализированного совета 042 по Экспериментальной биологии, в Институте
молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна, 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
НАН РА и на сайте <http://molbiol.sci.am>

Автореферат разослан 24 сентября 2014г.

Ученый секретарь специализированного совета 042,
кандидат биол. наук

Г.М. Мкртчян



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В развитие многофакторных заболеваний вносят вклад как генетические, так и негенетические факторы. Предрасположенность к этим болезням детерминируется наследованием и соответственно комплексным воздействием функционально ослабленных вариантов генов, каждый из которых по отдельности не приводит к развитию заболевания. Полиморфизм генов определяет этнические и популяционные отличия генетических вариаций, обуславливающих предрасположенность к тому или иному комплексному заболеванию. Чем выше генетическая предрасположенность организма к тому или иному комплексному заболеванию, тем менее интенсивным и длительным должно быть воздействие факторов окружающей среды для запуска соответствующего патологического процесса [Бочков, 2002; Vignal et al, 2002; Petkova et al, 2007; Ramos & Olden, 2008; Janssens & van Duijn, 2008]. Молекулярно-генетические этиопатомеханизмы генерации и развития многофакторных заболеваний, в отличие от таковых моногенных болезней, гораздо менее изучены, что в значительной степени затрудняет разработку эффективных методов и средств ранней диагностики, лечения и профилактики осложнений этих заболеваний. К таким заболеваниям относятся многие тяжелые психические болезни, в том числе и шизофрения (ШФ) [Sawa & Snyder, 2002; Glessner & Hakonarson, 2009; International Schizophrenia Consortium, 2009]. Эта на сегодняшний день неизлечимая болезнь, как правило, проявляется в юношеском или раннем зрелом возрасте [World Health Organization, 1992; American Psychiatric Association, 2000]. Средняя инцидентность ШФ составляет 15,2 на 100 000 человек, а средняя распространенность на 1000 человек - 4,0 [Рахимов и др., 2010]. ШФ входит в первую десятку заболеваний с самым высоким показателем инвалидизации в возрастной группе от 15 до 44 лет и занимает третье место среди остальных заболеваний по показателю нетрудоспособных лет жизни [Rössler et al, 2005]. Распространенность ШФ в наши дни в расчете на мировую популяцию людей старше 18 лет составляет 1,1% (~25 млн человек) [Perälä et al, 2007]. Недавно было установлено, что риск развития ШФ повышается в странах, для которых характерен большой разрыв между богатством и бедностью (rich-poor gap) [Burns, et al, 2014]. Распространенность ШФ среди населения Республики Армения составляет 0,18% [Soghoyan et al, 2003]. Молекулярно-генетические этиопатомеханизмы ШФ, вклад в ее развитие генетических и негенетических факторов и их взаимодействие сегодня интенсивно исследуются многими научными подразделениями по всему миру с целью разработки на основе полученных результатов действенных эффективных методов ранней диагностики и лечения этого заболевания.

Ряд экспериментальных и клинических данных, в том числе и ранее полученных в нашей лаборатории, свидетельствуют, что в патофизиологические процессы, наблюдаемые при ШФ, вовлечены нарушения иммунного ответа организма, включая развитие воспалительных и аутоиммунных реакций, как на уровне ЦНС, так и на

системном уровне [Маилян, 2000; Акопян, 2005; Хоецян, 2008; Mayilyan & Weinberger, 2008; Mayilyan et al, 2008; Potvin et al, 2008; Müller & Schwarz, 2010; Drexhage et al, 2011; Boyajyan et al, 2012; Захарян, 2013; Чавушян, 2013; Zakharyan & Boyajyan, 2013; Debnath & Berk, 2014; Müller, 2014], и эти процессы находятся в тесной взаимосвязи с характерными для ШФ нарушениями нейрональной пластичности и синаптической проводимости и дефектами когнитивных функций [Muller & Schwarz, 2006; Müller & Schwarz, 2007; Drexhage et al, 2011; Karanikas, 2011; Fineberg & Ellman, 2013; Debnath & Berk, 2014; Müller, 2014; Na et al, 2014]. Однако, долевой вклад в отмеченные нарушения генетических и негенетических факторов пока еще недостаточно ясен, что в значительной степени лимитирует прогресс в плане понимания патомеханизмов, ответственных за генерацию и развитие ШФ. Следует также отметить, что недавно проведенный анализ и обобщение результатов модельных экспериментов позволяют придти к заключению, что при нейродегенеративных заболеваниях и патологиях нейронального развития, включая ШФ, сдвиги на уровне молекулярных медиаторов и регуляторов иммунного ответа, наблюдаемые на периферии (кровь) и в головном мозге, в полной мере коррелируют [Petitto et al, 2012].

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в изучении при ШФ (по сравнению с нормой) функционального состояния (экспрессии и функциональных полиморфизмов) генов регуляторов и медиаторов иммунного ответа, включая: (1) гены *E4F1*, *GATA3* и *TBX21*, кодирующие транскрипционные факторы E4F1, GATA3 и Tbx21, вовлеченные в провоспалительные сигнальные каскады и регуляцию иммунного ответа; (2) ген *ANXA11*, кодирующий эффекторный белок опосредуемых нейтрофилами аутоиммунных и воспалительных реакций – аннексин-A11; (3) гены *CFB*, *CFH* и *CFI*, кодирующие факторы В, Н и I системы комплемента - важнейшего медиатора воспалительных иммунных реакций. Выбор отмеченных факторов был обусловлен тем, что ранее проведенные в нашей лаборатории исследования выявили гиперактивацию альтернативного каскада комплемента при ШФ [Boyajyan et al, 2008; Хоецян, 2008; Boyajyan et al, 2010; Boyajyan et al, 2012]. Фактор В является ключевым компонентом этого каскада, а факторы Н и I - его «негативными регуляторами» [Meri & Jarva, 2001; Zipfel, 2001; Zipfel & Skerka, 2009]; (3) гены *IL2*, *IL23A* и *IL2RG*, кодирующие воспалительные цитокины интерлейкин(IL)-2, IL-23α и γ-рецептор IL-2 (*IL2RG*). Хотя ранее проведенные как в нашей лаборатории, так и со стороны других научных групп исследования выявили вовлечение функциональных нарушений (на уровне экспрессии мРНК или генетических вариаций) многих представителей воспалительных цитокинов и их рецепторов в патогенез ШФ [Fan et al, 2007; Potvin et al, 2008; Monji et al, 2010; Watanabe et al, 2010; Boyajyan et al, 2012; Fineberg & Ellman, 2013; Захарян, 2013; Zakharyan & Boyajyan, 2014; Na et al, 2014], однако, IL-2, IL-23α и γ-рецептор IL-2 практически не были изучены. Последний представлял особый интерес, поскольку он, по сути, является γ-субъединицей ряда рецепторов, посредством которых реализуют свое действие многие цитокины [Sugamura et al, 1995; Recher et al, 2011; Meazza et al, 2011].

Научная новизна и научно-практическая значимость работы. В настоящей работе нами было проведено сравнительное определение уровней экспрессии десяти генов, кодирующих регуляторы и модуляторы иммунного ответа, включая факторы транскрипции E4F1, GATA3 и Tbx21, аннексин-A11, факторы альтернативного каскада комплемента B, H и I, а также IL-2, IL-23 α и γ -рецептор IL-2 в лейкоцитах больных ШФ и здоровых лиц (ЗЛ). Также исследована ассоциация с ШФ восьми функциональных однонуклеотидных полиморфизмов вышеотмеченных генов путем генотипирования образцов геномной ДНК больных ШФ и ЗЛ по соответствующим полиморфизмам и последующего сравнительного анализа полученных данных.

Фундаментальная значимость настоящей работы заключается в том, что ее результаты в значительной степени расширяют существующие представления о молекулярных этиопатомеханизмах ШФ как в целом, так и на уровне нарушений иммунного статуса организма. Впервые установлено, что ШФ характеризуется нарушением экспрессии генов, кодирующих такие важнейшие регуляторы и медиаторы иммунного ответа как аннексин-A11, IL-2 и γ -рецептор IL-2. Выявлены новые «кандидатные гены» этого заболевания и положительно либо отрицательно ассоциированные с ним однонуклеотидные замены в этих генах. Полученные данные дополняют современные знания о генетических и негенетических факторах, ответственных за развитие ШФ. Кроме того, в результате проведения настоящего исследования впервые выявлен ряд характерных, по крайней мере для армян, вариаций в генах *IL2*, *CFH* и *CFI*, обуславливающих предрасположенность к ШФ. Это особенно важно, учитывая тот факт, что распространенность функционально значимых генетических полиморфизмов, структура гаплотипов и неравновесия по сцеплению, а также их ассоциация с тем или иным заболеванием может варьировать в зависимости от этнической истории популяции [Бочков, 2002; Трифонова и др., 2012]. Также впервые показано, что мутантный аллель rs1261 полиморфизма гена *CFB* играет протекторную роль в плане развития ШФ, по крайней мере у армян.

В аспекте прикладной значимости результаты настоящего исследования создают серьезные предпосылки для разработки новых эффективных подходов к диагностике ШФ, основанных на скрининге генов, кодирующих медиаторы и регуляторы иммунного ответа, а также для ее лечения, направленного на нормализацию уровней экспрессии *ANXA11*, *IL2* и *IL2RG*.

Апробация работы. Основные результаты настоящей работы были представлены и обсуждены на студенческой годичной научной конференции Российско-Армянского университета (Армения, 2011), научной межвузовской конференции «Современные тенденции развития биологии», конференции молодых ученых «Новые аспекты молекулярной биотехнологии и биохимии» (Армения, 2013), XIV Европейском конгрессе «Комплемент при заболеваниях человека» (Германия, 2013), XV международном иммунологическом конгрессе (Италия, 2013), тематической конференции всемирной психиатрической ассоциации «Психическое здоровье и психические болезни: фокус на Евразию»

(Армения, 2013), VIII Всероссийской научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2014» (Россия, 2014), семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (2011-2014).

Публикации. Результаты настоящего исследования отражены в 11-и публикациях.

Объем и структура работы. Работа изложена на 124 страницах машинописного текста, содержит 25 таблиц и 36 рисунков, состоит из списка использованных сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. В литературном обзоре представлены современные представления об аннексине-A11, альтернативном каскаде комплемента и γ -рецепторе IL-2 в норме и при патологиях. Экспериментальная часть включает описание субъектов, объектов и методов исследования - препаративных и аналитических процедур, а также статистических методов обработки полученных данных и использованных в работе приборов и реактивов. Глава «Результаты исследования и их обсуждение» состоит из 4-х разделов. В «Заключении» коротко обобщены основные результаты исследования. На основании полученных данных сделано 7 выводов. Список цитируемой литературы содержит 276 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории геномики и иммуномики человека Института молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения (НАН РА).

Субъектами исследования являлись хронические больные параноидной формой ШФ (код ICD-10: F20.0 [World Health Organization, 1992]; код DSM-IV-TR: 295.30 [American Psychiatric Association, 2000]), а также физически и психически здоровые лица (ЗЛ) без наследственной предрасположенности к ШФ или каким-либо другим психическим расстройствам, соответствующие больным ШФ по возрасту и полу (контрольная группа). Все субъекты исследования были этническими армянами, не состоявшими в родственных связях друг с другом, проживающими на территории РА. Больные ШФ находились на лечении в клиниках Психиатрического медицинского центра Министерства здравоохранения (МЗ) РА. Диагностирование больных ШФ проводили врачи-психиатры вышеотмеченных медицинских учреждений на основе критериев ICD-10 и DSM-IV-TR. Все больные ШФ принимали типический нейрорептик галоперидол. Контрольную группу составили доноры медицинского центра «Эребуни» МЗ РА. В целом в эксперименты было вовлечено 225 больных ШФ и 225 ЗЛ. Все субъекты были проинформированы о предстоящем исследовании и дали свое согласие на взятие крови. На проведение настоящего исследования было получено разрешение Комитета по этике Института молекулярной биологии НАН РА (IRB #00004079).

Объектами исследования являлись образцы геномной ДНК и мРНК лейкоцитов периферической крови (ЛПК) субъектов исследования.

Забор крови проводили пункцией из локтевой вены между 9 и 10 часами утра натощак. Кровь брали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Образцы цельной крови помещали на лед и сразу же использовали для получения геномной ДНК и выделения ЛПК, из которых затем получали суммарную РНК. **Для выделения ЛПК** к 5 мл цельной крови добавляли 10 мл лизирующего эритроциты раствора, включающего в свой состав 0,144 М NH_4Cl и 1мМ NaHCO_3 . Через 5 мин смесь центрифугировали 10 мин x 1000g, надосадочный раствор сливали, а осадок осторожно ополаскивали вышеотмеченным буфером, далее ресуспендировали в 5мл этого буфера и центрифугировали 10мин x1000g. Затем надосадочный раствор сливали, а осадок, представляющий собой ЛПК, ресуспендировали в 50мкл фосфатно-солевого буфера, pH 7,4 (PBS; Oxoid Ltd.). Далее к суспензии добавляли 100 мкл РНК-стабилизирующего раствора («RNAlater», Ambion Inc). В таком виде клетки хранили при -20°C до получения из них препаратов суммарной РНК. **Очистку суммарной РНК из ЛПК** проводили при использовании коммерческого набора реагентов («High pure miRNA isolation kit», Roche Applied Science Inc) согласно инструкции производителя. **Выделение геномной ДНК** из образцов цельной крови проводили по ранее описанному методу [Sambrook & Russel, 2001]. **Для определения концентрации ДНК и РНК в полученных препаратах** измеряли оптическую плотность в ультрафиолетовой (УФ) области спектра при длине волны 260 нм (A_{260}), соответствующей максимуму оптического поглощения ДНК/РНК и рассчитывали концентрацию ДНК/РНК в препаратах, основываясь на том, что для двухспиральной ДНК $A_{260}=1$ соответствует концентрации 50 мкг/мл, а для одноцепочечной РНК $A_{260}=1$ соответствует концентрации 40 мкг/мл. **Анализ целостности препаратов ДНК и РНК проводили электрофорезом (ЭФ)** в 1% агарозном геле при условиях, описанных ниже для продуктов амплификации ДНК. О целостности полученных препаратов ДНК и РНК судили по отсутствию фрагментов - путем сопоставления электрофореграмм исследуемых образцов и стандартов олигонуклеотидов известной длины, подвергнутых той же процедуре, что и исследуемые образцы. В работе были использованы препараты ДНК и РНК с максимальной степенью целостности. **Чистоту полученных препаратов ДНК и РНК определяли спектрофотометрически**, измерением поглощения в УФ области оптического спектра при длине волны 280, 260 и 230нм (A_{280} , A_{260} и A_{230} , соответственно) с последующим определением соотношений A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . В полученных нами препаратах ДНК и РНК соотношение A_{260}/A_{280} составляло 1,8 и 2,8, соответственно, а соотношение A_{260}/A_{230} - 2,1-2,2, что свидетельствует о достаточно высокой степени очистки этих препаратов.

Определение уровней экспрессии исследуемых генов, краткая характеристика которым дана в таблице 1, проводили в два этапа, основываясь на ранее разработанных методах [Jozefczuk & Adjaye, 2011]. На 1-ом этапе проводили клонирование исследуемых генов - синтез комплементарных мРНК цепей ДНК (кДНК) при использовании препаратов РНК, выделенных из ЛПК. На 2-ом этапе после проведения амплификации кДНК измеряли ее количество с помощью количественной полимеразной цепной реакции в

реальном времени (qRT-PCR). **Клонирование генов осуществляли путем проведения реакции обратной транскрипции** при использовании образцов суммарной РНК, выделенной из ЛПК субъектов исследования, и коммерческого набора реагентов для синтеза кДНК («Transcriptor first strand cDNA synthesis kit», Roche Applied Science Inc.) согласно инструкции производителя. В качестве затравки использовали набор «заякоренных олиго (dT) праймеров» (ABgene Ltd.) - смесь олигонуклеотидов разной длины из остатков Т, последовательности которых комплементарны 3'-концевой поли(А)-последовательности мРНК. В результате на основе мРНК, содержащихся в препаратах суммарной РНК, образуются кДНК. Синтезированные препараты кДНК хранили при -20°C. **Уровни экспрессии исследуемых генов оценивали методом qRT-PCR на основе измерения количества кДНК** данного гена после ее денатурации и амплификации. Амплификацию кДНК проводили при использовании термостабильной ДНК-полимеразы (Taq-полимеразы), смеси дезоксинуклеозидтрифосфатов, флуоресцентных зондов, 5'-смыслового и 3'-антисмыслового праймеров. При измерении уровней экспрессии генов *ANXA11*, *IL2RG*, *IL2*, *IL23A*, *E4F1*, *GATA3* и *TBX21* в конечном объеме реакционной смеси (25мкл) содержалось 20 нг кДНК, 900 нМ каждого праймера, 100 нМ зонда, 3,5 мМ MgCl₂, по 200 мкМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов и 1 единица Taq-полимеразы (ABgene Ltd.). В качестве флуоресцентных зондов использовали «замкнутые нуклеиновые кислоты» (LNA; Roche Applied Science Inc.). Выбор зондов и дизайн праймеров осуществляли при использовании базы данных «Универсальная библиотека зондов» (www.roche-applied-science.com), снабженной аппликационным пакетом «Probe Finder». При измерении уровней экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI* использовали наборы «PrimeTime™ Std qPCR Assay» (Integrated DNA Technologies Inc.), согласно инструкции производителя, в состав которых входят все необходимые для этого реагенты, включая Taq-полимеразу, праймеры и гидролизуемые зонды «FAM, ZEN, 3IABkFQ». В случае всех исследуемых генов в качестве стандарта использовали универсальную смесь молекул кДНК, комплементарных мРНК человека (Stratagene), которую подвергали тем же процедурам, что и исследуемые гены, а в качестве контроля использовали ген, кодирующий β-субъединицу протеосомы типа-2 (*PSMB2*), относящийся к «генам домашнего хозяйства». Для определения уровня экспрессии гена *PSMB2* кДНК подвергали тем же процедурам, что и исследуемые гены. В случае всех исследуемых генов реакционную смесь далее помещали в термоциклер для qRT-PCR «RotorGene 3000» (Corbett Research Pty Ltd.) со встроенным аппликационным пакетом «RotorGene Software 6.1.71». После одного цикла денатурации (94°C x 15 мин) проводили 40 циклов амплификации. Каждый цикл включал две последовательные инкубации: 94°C x 45 сек и 60°C x 30 сек. Затем регистрировали накопление специфического продукта амплификации путем измерения относительной интенсивности флуоресцентного сигнала. Данные анализировали, используя программное обеспечение прибора. Уровень экспрессии гена выражали в условных единицах (у.е.) относительной экспрессии - по отношению к уровню экспрессии гена *PSMB2*.

Таблица 1.

Краткая характеристика исследованных генов.

Название гена	ID	Локализация на хромосоме	Название гена	ID	Локализация на хромосоме
<i>ANXA11</i>	311	10q21-23	<i>IL23A</i>	51561	12q13.3
<i>CFB</i>	629	6p21.3	<i>IL2RG</i>	3561	Xq13.1
<i>CFH</i>	3075	1q32	<i>E4F1</i>	1877	16p13.3
<i>CFI</i>	3426	4q25	<i>GATA3</i>	2625	10p15
<i>IL2</i>	3558	4q26-27	<i>TBX21</i>	30009	17q21.32

ID - идентификатор (код гена в базе данных «GenBank» (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)).

Генотипирование образцов ДНК. Выбор однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) исследуемых генов для последующего изучения их ассоциации с ШФ проводили при использовании баз данных и геномных браузеров Национального центра биотехнологической информации США (www.ncbi.nlm.nih.gov) и международного проекта HarMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Выбор был основан на функциональной значимости полиморфизмов, частоте встречаемости минорного аллеля и результатах «tagging»-анализа. В итоге были выбраны следующие SNPs исследуемых генов: *ANXA11* rs1049550; *CFB* rs12614; *CFH* rs424535, rs800292, rs1061170; *CFI* rs10033900; *IL2* rs2069778; *IL23A* rs11171806. В таблице 2 дана их краткая характеристика. **Анализ выбранных полиморфизмов исследуемых генов** проводили методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (PCR-SSP) [Bunce et al, 1995], используя термоциклер «iCycler» (Bio-Rad Laboratories Inc.). Дизайн праймеров для PCR-SSP осуществлялся при использовании базы данных «GenBank» (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). **ЭФ продуктов амплификации ДНК** проводили по стандартной процедуре [Bunce et al, 1995] на приборе «Wide Mini-Sub Cell GT» (Bio-Rad Laboratories Inc.) в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий (БЭ). ДНК в геле визуализировали в темноте с использованием УФ лампы - по флуоресценции БЭ, связавшегося с ДНК.

Таблица 2.

Краткая характеристика исследованных полиморфизмов.

SNP ID	Нуклеотидная замена	Позиция	Локализация (тип мутации)
rs104955	G/A	81916682	экзон (миссенс)
rs12614	C/T	31946402	экзон (миссенс)
rs424535	T/A	196740093	интрон
rs800292	G/A	196673103	экзон (миссенс)
rs1061170	T/C	196690107	экзон (миссенс)
rs10033900	T/C	109737911	интрон
rs2069778	C/T	122454980	интрон
rs11171806	G/A	56339747	экзон (синонимичная)

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов «Graphpad Prism» (GraphPad Software Inc.) и «SPSS» (IBM Corp.). Данные, полученные при изучении экспрессии генов проверяли на нормальность распределения при помощи W-критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данных (экспрессия генов *CFB*, *CFH*, *CFI*), их анализировали, используя непарный t-тест Стьюдента и корреляционный анализ Пирсона, а в случае отклонения данных от нормального распределения (экспрессии генов *ANXA11*, *IL2*, *IL23A*, *IL2RG*, *E4F1*, *GATA3*, *TBX21*) для анализа данных использовали U-тест Манна-Уитни и корреляционный анализ Спирмена. При проведении корреляционного анализа рассчитывали коэффициент корреляции (R). Распределение генотипов в исследуемых группах для каждого полиморфизма проверяли на соответствие закону Харди-Вайнберга (Х-В). Частоту встречаемости генотипов, аллелей и носителей мутантных аллелей в исследуемых группах рассчитывали на основе данных ЭФ (по числу и местоположению соответствующих полос в геле). Достоверность различий по этим параметрам между больными ШФ и ЗЛ определяли по χ^2 -критерию Пирсона, рассчитывая отношение шансов (OR) и 95%-ый доверительный интервал (CI). Значения $p < 0,05$ принимали как статистически значимые. Статистическую мощность исследования определяли как описано ранее [Lalouel & Rohrwasser, 2002] на основе сравнения частоты встречаемости носителей мутантного аллеля в группах больных ШФ и ЗЛ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение функционального состояния генов *E4F1*, *GATA3* и *TBX21* при ШФ

Гены *E4F1*, *GATA3* и *TBX21* кодируют транскрипционные факторы, участвующие в регуляции ряда процессов, в том числе и иммунного ответа и проведения провоспалительных сигналов [Peng, 2006; Lazarevic et al, 2006; Wyllie et al, 2012; Lazarevic et al, 2013; Hoyle et al, 2014; Wan, 2014]. В целях изучения активности этих генов при ШФ мы провели сравнительный анализ их экспрессии в ЛПК больных ШФ и ЗЛ. Согласно полученным данным (табл. 3), статистически значимых различий между уровнями экспрессии генов *E4F1*, *GATA3* и *TBX21* у больных ШФ и ЗЛ не наблюдается ($p > 0,05$).

Таблица 3.

Результаты сравнительного анализа уровней экспрессии генов *E4F1*, *GATA3* и *TBX21* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ.

Ген	Относительная экспрессия (медиана [интерквартильный размах]), у.е.		p
	Больные ШФ	ЗЛ	
<i>E4F1</i>	0,561 [1,715-0,211]	0,862 [5,253–0,341]	0,096
<i>GATA3</i>	1,099 [1,437-0,467]	0,745 [2,498–0,245]	0,353
<i>TBX21</i>	0,083 [0,164-0,031]	0,079 [0,151–0,026]	0,757

Мы не обнаружили статистически значимых различий в уровнях экспрессии исследуемых генов между мужчинами и женщинами в обеих группах ($p > 0,05$). Корреляционный анализ также не выявил какой-либо статистически значимой корреляции между уровнями экспрессии исследуемых генов и такими клинико-демографическими характеристиками больных ШФ как возраст первой манифестации заболевания и его длительность ($p > 0,05$). Однако, хотя в группе больных ШФ не наблюдалось какой-либо статистически значимой корреляции между уровнями экспрессии исследуемых генов и возрастом больных ШФ ($p > 0,05$), в группе ЗЛ наблюдалась статистически значимая положительная корреляция ($R = 0,304$, $p = 0,002$) между возрастом субъектов и уровнем экспрессии гена *E4F1*. В случае генов *GATA3* и *TBX21* у ЗЛ, как и у больных, не наблюдалось какой-либо значимой корреляции между вышеотмеченными параметрами ($p > 0,05$).

Таким образом, согласно результатам этой части исследования, у больных хронической формой параноидной ШФ экспрессия генов, кодирующих факторы транскрипции E4F1, GATA3 и Tbx21, в ЛПК находится в пределах нормы. Отметим, что хотя эти гены и их продукты были исследованы при многих патологиях [Barnes, 2008; Zheng & Blobel, 2010; Lazarevic & Glimcher, 2011; Hatchi et al, 2011; Rayees et al, 20014; Sharma et al, 2014; Woo et al, 2014], однако при ШФ они впервые изучены нами.

2. Изучение функционального состояния гена *ANXA11* при ШФ

Кодируемый геном *ANXA11* аннексин-A11 является эффекторным белком опосредуемых нейтрофилами аутоиммунных и воспалительных реакций, [Misaki et al, 1994; Sjolín et al, 1997; Pittis & Garcia, 1999; Song et al, 2009; Wang et al, 2014]. Учитывая, как отмечено во введении, что патогенез ШФ характеризуется развитием воспалительных и аутоиммунных реакций как на уровне ЦНС, так и на системном уровне, нам представлялось интересным исследовать функциональное состояние гена *ANXA11* при ШФ. С этой целью мы впервые провели сравнительное определение уровней экспрессии этого гена в ЛПК у больных ШФ и ЗЛ, а также исследовали возможную ассоциацию rs1049550 функционального однонуклеотидного полиморфизма гена *ANXA11* с ШФ.

Как показали данные, полученные при изучении экспрессии гена *ANXA11* (рис. 1), медианный уровень экспрессии этого гена в группе больных ШФ в 7 раз превышал таковой в группе ЗЛ (медиана [интерквартильный размах]: 0,586 [1,449–0,262] против 0,079 [0,430–0,000], соответственно, $p = 0,0001$). Нами не было выявлено статистически значимых различий в уровнях экспрессии гена *ANXA11* между мужчинами и женщинами в обеих исследуемых группах ($p > 0,05$). Корреляционный анализ не выявил какой-либо статистически значимой корреляции между уровнями экспрессии гена *ANXA11* и клинико-демографическими характеристиками больных ШФ, такими как возраст первой манифестации заболевания и его длительность ($p > 0,05$). Последнее позволяет исключить вероятность того, что повышенные по сравнению с нормой уровни экспрессии гена *ANXA11* у больных ШФ обусловлены воздействием принимаемого ими нейролептика галоперидола, длительность приема которого практически соответствует длительности

заболевания. Однако, если в группе больных ШФ наблюдалась статистически значимая отрицательная корреляция между уровнями экспрессии гена *ANXA11* и возрастом больных ШФ ($R = -0,215$; $p = 0,029$), то в группе ЗЛ какой-либо статистически значимой корреляции между отмеченными параметрами не наблюдалось ($p > 0,05$).

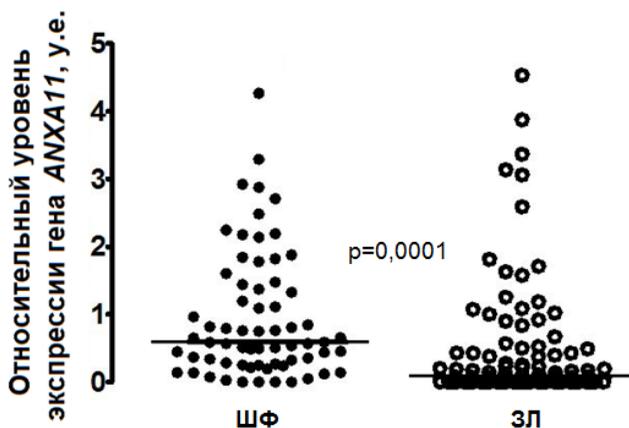


Рисунок 1. Уровни экспрессии гена *ANXA11* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ.

Данные представлены в виде графика «дот-плот». Горизонтальные линии - медианы.

Далее мы изучили возможную ассоциацию rs1049550 полиморфизма гена *ANXA11* с ШФ путем генотипирования образцов геномной ДНК больных ШФ и ЗЛ по данному полиморфизму и последующего сравнительного анализа полученных данных. Отметим, что rs1049550 полиморфизм в 5-ом экзоне гена *ANXA11* приводит к замене аргинина на цистеин в 230-ой позиции полипептидной цепи аннексина-A11. Согласно полученным результатам, распределение генотипов полиморфизма rs1049550 гена *ANXA11* в группах больных ШФ и ЗЛ соответствовало уравнению X–B ($p > 0,05$). В группах больных ШФ и ЗЛ не наблюдалось статистически значимых различий между частотой встречаемости генотипов, аллелей и HMA rs1049550. Так, частота встречаемости rs1049550*A мутантного аллеля у больных ШФ составляет 0,44 (в долях единицы), а у ЗЛ - 0,42, ($OR = 0,93$, 95%CI: 0,714-1,211, $p = 0,637$). Частота носительства rs1049550*A мутантного аллеля у больных ШФ составляет 0,70 а у ЗЛ - 0,66 ($OR = 0,831$, 95%CI: 0,559-1,237, $p = 0,418$). Статистическая мощность исследования равна 23,17%. Мы также изучили зависимость между генотипами rs1049550 и уровнями экспрессии гена *ANXA11*. В обеих исследуемых группах у гомозиготных по rs1049550G стандартному аллелю субъектов (GG) медианные уровни экспрессии гена *ANXA11* были в 3 раза ниже, чем у HMA (GA + AA).

Таким образом, результаты этой части исследования свидетельствуют о гиперэкспрессии гена *ANXA11* при ШФ и об отсутствии ассоциации между функциональным полиморфизмом rs1049550 гена *ANXA11* и ШФ. Как показали наши данные, несмотря на

то, что, мутантный аллель полиморфизма rs1049550 обуславливает больший уровень экспрессии гена *ANXA11*, очевидно, что наблюдаемые нами различия в экспрессии этого гена между больными ШФ и ЗЛ не связаны с данным полиморфизмом, поскольку распределение генотипов, аллелей и НМА для rs1049550 в группах больных ШФ и ЗЛ практически идентично. Интересно, что ранее сотрудниками нашей лаборатории и других исследовательских групп было показано, что ШФ характеризуется нарушениями функционального состояния таких представителей семейства аннексинов, как аннексин-А5 и -А7 [Liu et al, 2011; Francesconi et al, 2011; Boyajyan et al, 2013]. Результаты настоящей работы однозначно свидетельствуют об участии в патомеханизмах ШФ еще одного представителя семейства аннексинов - аннексина-А11. Мы полагаем, что гиперэкспрессия гена *ANXA11* в ЛПК при ШФ, скорее всего, связана с компенсаторной реакцией организма на наблюдаемую при ШФ системную гиперактивацию иммунной системы [Mayilyan & Weinberger, 2008; Mayilyan et al, 2008; Boyajyan et al, 2012; Захарян, 2013; Чавушян, 2013; Zakharyan & Boyajyan, 2013] и гиперфункцию апоптоза [Boyajyan et al, 2013; Чавушян, 2013], одним из регуляторов которых является аннексин-А11 [Pittis & Garcia, 1999; Sjolín et al, 1997; Song et al, 2009; Wang et al, 2014].

3. Изучение функционального состояния генов *CFB*, *CFH* и *CFI* при ШФ

Как уже было отмечено во введении, ранее проведенные в нашей лаборатории исследования выявили, что в нарушение иммунного статуса организма при ШФ вовлечена гиперактивация альтернативного каскада комплемента. В частности, нами было установлено, что гемолитическая активность этого каскада, а также активность его начального звена компоненты С3 в крови как хронических, так и первичных больных ШФ намного превышают характерные для нормы уровни [Boyajyan et al, 2008; Хоецян, 2008; Boyajyan et al, 2010; Boyajyan et al, 2012]. Фактор В является важнейшим ключевым компонентом альтернативного каскада комплемента, а «негативная регуляция» этого каскада осуществляется факторами Н и I [Meri & Jarva, 2001; Zipfel, 2001; Zipfel & Skerka, 2009]. Для выяснения механизмов, лежащих в основе гиперактивации альтернативного каскада комплемента при ШФ, мы изучили функциональный статус генов, кодирующих факторы В, Н и I. С этой целью мы впервые провели сравнительное определение уровней экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ, а также изучили возможную ассоциацию с ШФ функциональных однонуклеотидных полиморфизмов этих генов.

Согласно данным, полученным при изучении экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI*, средние значения уровней экспрессии этих генов в группе больных ШФ практически не отличаются от аналогичных параметров в группе ЗЛ (табл. 4). Нами также не было выявлено статистически значимых различий в уровнях экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI* между мужчинами и женщинами в обеих исследуемых группах, как и корреляции между уровнями экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI* и клинико-демографическими характеристиками больных ШФ, такими как возраст первой манифестации и длитель-

ность заболевания ($p>0,05$). Статистически значимой корреляции между уровнями экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI* и возрастом больных ШФ и ЗЛ также не наблюдалось ($p>0,05$).

Результаты этого этапа исследования свидетельствуют, что гиперактивация альтернативного каскада комплемента при ШФ не является следствием изменения экспрессии генов *CFB*, *CFI* и *CFH*.

Таблица 4.

Результаты сравнительного анализа уровней экспрессии генов *CFB*, *CFH* и *CFI* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ.

Ген	Относительная экспрессия (M±δ), у.е.		P
	Больные ШФ	ЗЛ	
<i>CFB</i>	0,276±0,134	0,284±0,130	0,704
<i>CFH</i>	0,255±0,132	0,273±0,131	0,391
<i>CFI</i>	0,231±0,120	0,239±0,104	0,635

На следующем этапе мы изучили возможную ассоциацию с ШФ функциональных однонуклеотидных полиморфизмов rs12614, rs10033900 и rs800292, rs424535, rs1061170 генов *CFB*, *CFI*, и *CFH*, соответственно, путем генотипирования образцов геномной ДНК больных ШФ и ЗЛ по данным полиморфизмам и последующему сравнительному анализу полученных данных. Распределение генотипов данных полиморфизмов в группах больных ШФ и ЗЛ соответствовало уравнению Х-В ($p>0,05$). Согласно полученным данным, ассоциация с ШФ наблюдалась в случае rs12614 полиморфизма гена *CFB*, rs424535 и rs1061170 полиморфизмов гена *CFH* и rs10033900 полиморфизма гена *CFI*. Частота встречаемости генотипов, аллелей и НМА этих полиморфизмов в группе больных ШФ значимо отличались от аналогичных параметров в группе ЗЛ ($p<0,05$).

Следует отметить, что ранее на белковом уровне нами были получены косвенные данные, свидетельствующие об ассоциации между ШФ и rs1061170 полиморфизмом гена *CFH* [Воуајуан et al, 2012]. Результаты настоящего исследования подтвердили этот результат. В случае полиморфизмов rs424535, rs1061170 гена *CFH* и rs10033900 гена *CFI* мы наблюдали положительную ассоциацию с ШФ, а в случае rs12614 полиморфизма гена *CFB* - отрицательную. Иными словами, частота встречаемости мутантных аллелей rs424535*А и rs1061170*С гена *CFH*, а также rs10033900*С гена *CFI* в группе больных ШФ статистически значимо превышает аналогичные параметры в группе ЗЛ (0,5 против 0,4, OR=0,679, 95%CI: 0,523-0,884, $p=0,005$; 0,46 против 0,34, OR=1,670, 95%CI: 1,276-2,186, $p=0,0002$ и 0,61 против 0,47, OR=0,572, 95%CI: 2,899-6,752, $p=0,0001$, соответственно), в то время как частота встречаемости мутантного аллеля rs12614*Т гена *CFB* в группе больных ниже, чем в группе ЗЛ (0,07 против 0,25, OR=4,426, 95%CI: 2,899-6,752, $p=0,0001$). Соответственно, частота НМА rs424535*А и rs1061170*С гена

CFH и rs10033900*С гена *CFI* в группе больных статистически значимо превышают аналогичные параметры в группе ЗЛ (0,75 против 0,66, OR=0,652, 95%CI: 0,434-0,980, $p=0,04$, статистическая мощность = 90%; 0,73 против 0,66, OR=2,037, 95%CI: 1,372-3,025, $p=0,0005$, статистическая мощность = 99,4% и 0,844 против 0,69, OR=0,416, 95%CI: 0,263-0,659, $p=0,0002$, статистическая мощность = 98,6%, соответственно), в то время как частота НМА rs12614*Т гена *CFB* в группе больных ниже, чем в группе ЗЛ (0,14 против 0,44, OR=5,006, 95%CI: 3,156-7,942, $p=0,0001$, статистическая мощность = 99,9%). Кроме того, среди больных ШФ гораздо чаще встречаются лица с гомозиготными генотипами по мутантным аллелям rs424535*А, rs1061170*С гена *CFH* и rs10033900*С гена *CFI*, чем в группе ЗЛ (25% против 15%, $p=0,04$, 19% против 11%, $p=0,0005$ и 37,8% против 25%, $p=0,0002$, соответственно), тогда как для rs12614 полиморфизма гена *CFB* среди больных ШФ гомозигот по мутантному аллелю не было обнаружено, а среди ЗЛ - 5%. (рис. 2).

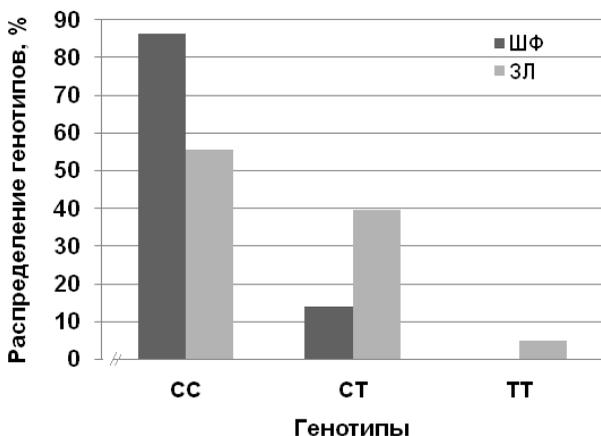


Рисунок 2. Распределение генотипов полиморфизма rs12614 гена *CFB* в группах больных ШФ и ЗЛ.

В случае rs800292 полиморфизма гена *CFH* частота встречаемости генотипов, аллелей и НМА этого полиморфизма в группе больных ШФ статистически значимо не отличалась от аналогичных параметров в группе ЗЛ (0,19 против 0,14, OR=0,793, 95%CI: 0,497-1,013, $p=0,071$ и 0,33 против 0,24, OR=0,711, 95%CI: 0,474-1,067, $p=0,123$, статистическая мощность = 59,9%, соответственно). Отметим, однако, что среди больных ШФ гораздо чаще, чем среди ЗЛ встречались гомозиготные носители мутантного аллеля rs800292*А гена *CFH* (9% против 4%, соответственно).

Таким образом, результаты, полученные на втором этапе исследования функционального состояния генов *CFB*, *CFI* и *CFH* позволили выявить в их лице новые «кандидатные гены» ШФ. При этом, как показали полученные данные, если наследование мутантных аллелей полиморфизмов rs424535, rs1061170 гена *CFH* и rs100339 гена

CFI повышает риск развития ШФ, то наследование мутантного аллеля полиморфизма rs12614 гена *CFB* понижает риск развития этого заболевания, а наследование мутантного аллеля rs800292 полиморфизма гена *CFH* влияет на риск развития ШФ только в том случае, если его мутантный аллель представлен в гомозиготной форме. Отметим, что полиморфизм rs424535 локализован в 17-ом интроне гена *CFH*, rs1061170 - в 9-ом экзоне этого гена и приводит к замене тирозина на гистидин в 402-ой позиции полипептидной цепи фактора Н, а rs800292 - во втором экзоне гена *CFH* и приводит к замене валина на изолейцин в 62-ой позиции полипептидной цепи фактора Н (www.snpedia.com/index.php/Rs800292). Полиморфизм rs100339 гена *CFI* локализован в 14-ом интроне этого гена, а полиморфизм rs12614 гена *CFB* в его втором экзоне и приводит к замене аргинина на триптофан в 32-ой позиции полипептидной цепи фактора В (www.snpedia.com/index.php/Rs800292). В литературе нами не было обнаружено других сообщений относительно исследования отмеченных полиморфизмов генов *CFB*, *CFI* и *CFH* (как и других полиморфизмов этих генов) при ШФ или других психических заболеваниях, однако они были изучены при некоторых других патологиях.

Мы также изучили зависимость между генотипами исследуемых полиморфизмов генов *CFB*, *CFI* и *CFH* в группах больных ШФ и ЗЛ и уровнями экспрессии этих генов. Оказалось, что в случае всех этих полиморфизмов у гомозиготных по стандартным аллелям субъектов и носителей мутантных аллелей средние уровни экспрессии генов *CFB*, *CFI* и *CFH* в МНПК практически не отличаются ($p > 0.05$). Эти результаты находятся в соответствии с полученными нами данными, показавшими, что несмотря на обнаруженную нами ассоциацию с ШФ большинства исследуемых полиморфизмов генов *CFB*, *CFI* и *CFH*, уровни экспрессии этих генов остаются в пределах нормы.

4. Изучение функционального состояния генов *IL2*, *IL23A* и *IL2RG* при ШФ

Воспалительные цитокины и их рецепторы довольно подробно исследованы при ШФ со стороны ряда научных групп, включая и нашу лабораторию. Показано их вовлечение в развитие воспалительных иммунных реакций при этой патологии как на генетическом, так и на белковом уровнях [Fan et al, 2007; Potvin et al, 2008; Monji et al, 2010; Watanabe et al, 2010; Boyajyan et al, 2012; Fineberg & Ellman, 2013; Захарян, 2013; Zakharyan & Boyajyan, 2014; Na et al, 2014]. Однако, функциональное состояние генов *IL2*, *IL23A* и *IL2RG*, кодирующих провоспалительные цитокины IL-2, IL-23 α и γ -рецептор IL-2, при ШФ практически не было исследовано. В настоящей работе мы провели сравнительное определение уровней экспрессии генов *IL2*, *IL23A* и *IL2RG* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ, а также изучение возможной ассоциации с ШФ функциональных однонуклеотидных полиморфизмов rs2069778 и rs11171806 этих генов, генотипированием образцов ДНК больных ШФ и ЗЛ по отмеченным полиморфизмам.

Согласно данным, полученным при изучении уровней экспрессии генов *IL2* и *IL2RG* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ, медианные уровни экспрессии генов *IL2* и *IL2RG* в группе больных ШФ статистически значимо в 21 раз ниже и в 6,5 раз выше,

соответственно, чем аналогичные параметры в группе ЗЛ ($p < 0,05$). Статистически значимых различий между медианными уровнями экспрессии гена *IL23A* при сравнении групп больных ШФ и ЗЛ мы не обнаружили ($p > 0,05$). Полученные результаты представлены в таблице 5. Нами также не было выявлено статистически значимых различий в уровнях экспрессии гена *IL2* и *IL23A* между мужчинами и женщинами в обеих исследуемых группах ($p > 0,05$), однако, в случае гена *IL2RG* в группе ЗЛ у женщин этот параметр в 2,8 раз статистически значимо превышал норму ($p = 0,01$), что может быть, в частности, следствием локализации *IL2RG* на X хромосоме. Корреляционный анализ не выявил какой-либо статистически значимой корреляции между уровнями экспрессии генов *IL2* и *IL23A* и такими клинико-демографическими характеристиками больных ШФ, как возраст первой манифестации заболевания и его длительность ($p > 0,05$). Последнее позволяет исключить вероятность того, что пониженные, по сравнению с нормой, уровни экспрессии гена *IL2* обусловлены воздействием нейролептика галоперидола, принимаемого больными ШФ, длительность приема которого практически соответствует длительности заболевания. В случае *IL2RG* мы также не обнаружили какой-либо статистически значимой корреляции между уровнями его экспрессии, вышеотмеченными клинико-демографическими характеристиками больных ШФ и их возрастом ($p > 0,05$). Последнее позволяет исключить воздействие галоперидола на наблюдаемое нами повышение уровней экспрессии гена *IL2RG* у больных ШФ по сравнению с нормой. Однако мы наблюдали статистически значимую положительную корреляцию между возрастом ЗЛ и уровнями экспрессии гена *IL2RG* ($R = 0,36$, $p = 0,0003$).

Таким образом, полученные на этом этапе результаты демонстрируют, что для хронической ШФ характерно нарушение экспрессии генов *IL2* и *IL2RG* в ЛПК, свидетельствующая о вовлечении *IL2* и *IL2RG* в дисфункцию иммунного статуса при ШФ.

Таблица 5.

Результаты сравнительного анализа уровней экспрессии генов *IL2*, *IL23A* и *IL2RG* в ЛПК больных ШФ и ЗЛ.

Ген	Относительная экспрессия (медиана [интерквартильный размах]), у.е.		p
	больные ШФ	ЗЛ	
<i>IL2</i>	0,069 [0,650-0,008]	1,469 [3,858-0,000]	0,0095
<i>IL23A</i>	0,132 [1,180-0,000]	0,272 [1,697-0,000]	0,4640
<i>IL2RG</i>	2,08 [3,428-1,046]	0,324 [0,856-0,000]	0,0001

На следующем этапе мы изучили возможную ассоциацию функциональных однонуклеотидных полиморфизмов rs2069778 и rs11171806 генов *IL2* и *IL23A*, соответственно, с ШФ путем генотипирования образцов геномной ДНК больных ШФ и ЗЛ по данным полиморфизмам и последующему сравнительному анализу полученных данных. Распределение генотипов исследованных полиморфизмов в группах больных

ШФ и ЗЛ соответствовало уравнению Х-В ($p>0,05$). Согласно полученным данным, ассоциация с ШФ наблюдалась в случае rs11171806 полиморфизма гена *IL23A*. Частота встречаемости генотипов, аллелей и НМА этого полиморфизма в группе больных ШФ статистически значимо отличалась от отмеченных параметров в группе ЗЛ ($p<0,05$). При этом мы наблюдали положительную ассоциацию отмеченного полиморфизма с ШФ. Иными словами, частота встречаемости мутантного аллеля rs11171806*А гена *IL23A* в группе больных ШФ превышает аналогичный параметр в группе ЗЛ (0,07 против 0,03, OR=0,435, 95%CI: 0,233-0,814, $p=0,011$). Соответственно, частота носительства мутантного аллеля rs11171806*А гена *IL23A* в группе больных ШФ превышает аналогичный параметр в группе ЗЛ (0,13 против 0,06, OR=0,431, 95%CI: 0,222-0,838, $p=0,0165$; статистическая мощность = 83%). Кроме того, среди больных ШФ гораздо чаще встречаются лица с гомозиготными генотипами по мутантному аллелю rs11171806*А гена *IL23A*, чем среди ЗЛ (1% против 0,4%). Для rs2069778 полиморфизма гена *IL2* ассоциации с ШФ мы не обнаружили. Частота встречаемости генотипов, аллелей и НМА этого полиморфизма в группе больных ШФ не отличалась от отмеченных параметров в группе ЗЛ ($p>0,05$). Так, частота встречаемости rs2069778*Т мутантного аллеля и у больных ШФ, и у ЗЛ составляет 0,17 (OR=0,984, 95%CI: 0,695-1,394, $p=1,0$), соответственно, частота НМА rs2069778*Т у больных ШФ составляет 0,29, а у ЗЛ - 0,30 (OR=1,022, 95%CI: 0,681-1,532, $p=1,0$; статистическая мощность = 6,16%). В обеих группах гомозиготные по мутантному аллелю лица составляли 4%. Все это свидетельствует о том, что наблюдаемая нами гипоекспрессия гена *IL2* при ШФ не обусловлена полиморфизмом rs2069778. Таблица 6 демонстрирует полученные данные.

Таблица 6.

Абсолютная и относительная (в долях единицы) частота встречаемости генотипов, аллелей и носителей мутантных аллелей (НМА) полиморфизмов rs2069778 и rs11171806 генов *IL2* и *IL23A* в группах больных ШФ и ЗЛ.

<i>IL2</i> rs2069778						
Группа	Генотип			Аллель		НМА
	CC	CT	TT	C	T	T
ШФ	159 (0,71)	56 (0,25)	10 (0,04)	374 (0,83)	76 (0,17)	66 (0,29)
ЗЛ	158 (0,70)	57 (0,26)	10 (0,04)	373 (0,83)	77 (0,17)	67 (0,30)
<i>P</i>					1,0	1,0
<i>IL23A</i> rs11171806						
Группа	Генотип			Аллель		НМА
	GG	GA	AA	G	A	A
ШФ	195 (0,87)	27 (0,12)	3 (0,01)	417 (0,93)	33 (0,07)	30 (0,13)
ЗЛ	211 (0,938)	13 (0,058)	1 (0,004)	435 (0,97)	15 (0,03)	14 (0,062)
<i>p</i>					0,011	0,0165

Нами не обнаружено какой-либо статистически значимой связи между уровнями экспрессии гена *IL23A* и генотипами его rs11171806 полиморфизма в обеих исследуемых группах ($p > 0,05$). Однако в случае полиморфизма rs2069778 гена *IL2* такая зависимость наблюдалась. В обеих группах у гомозиготных по стандартному аллелю лиц экспрессия гена *IL2* была ниже, чем у носителей мутантного аллеля ($p < 0,05$).

Результаты этой части исследования демонстрируют вовлечение нарушений на уровне функционального состояния генов, кодирующих IL-2, IL-23A и γ -рецептор IL-2 в патогенез ШФ. В случае генов *IL2* и *IL2RG* это, в первую очередь, проявляется на уровне нарушения экспрессии этих генов в иммунокомпетентных клетках крови больных ШФ, а для гена *IL23A* - наличием положительной ассоциации между ШФ и его функциональным однонуклеотидным полиморфизмом rs11171806. Последнее позволяет рассматривать мутантный аллель отмеченного полиморфизма как фактор риска развития ШФ. Отметим, что нарушение уровней экспрессии генов *IL2* и *IL2RG* при ШФ, а также ассоциация между ШФ и однонуклеотидным полиморфизмом rs11171806 гена *IL23A* впервые показано нами. Интересно, что, недавно проведенный анализ и обобщение результатов модельных экспериментов на животных показали, что гипоксепрессия IL-2 в ЦНС может инициировать развитие аутоиммунных реакций, характерных для многих нейродегенеративных заболеваний и патологий нейронального развития, включая ШФ [Petitto et al, 2012]. В случае экспрессии *IL2* наши данные находятся в соответствии с ранее полученными данными относительно пониженной, по сравнению с нормой, концентрации IL-2 в плазме/сыворотке крови больных ШФ [Mahendran et al, 2004; Singh et al, 2009; Asevedo et al, 2014]. Asevedo et al также изучили корреляцию между концентрацией IL-2 в плазме крови у больных ШФ, выраженностью у них негативных симптомов ШФ, оценками, полученными при прохождении теста «digit span» и значением IQ и пришли к выводу, что этот цитокин вовлечен в патомеханизмы, приводящие к характерным для ШФ ухудшению когнитивной функции и развитию негативной симптоматики [Asevedo et al, 2014]. В соответствии с нашими данными находятся и эксперименты *in vitro*, показавшие пониженную, по сравнению с нормой, секрецию этого белка в культуре лейкоцитов периферической крови [Arolt et al, 2000] и CD4+ субпопуляции Т-лимфоцитов, выделенных из крови больных ШФ [Zhang et al, 2002]. CD4+ клетки являются основными продуцентами IL-2 в популяции лейкоцитов. Основываясь на результатах этих исследований, было выдвинуто предположение, что пониженная продукция этого белка *in vivo* может отражать дефект Т-лимфоцитов, либо уменьшение их количества при ШФ [Zhang et al, 2002], и что отмеченные аномалии в продукции IL-2 не зависят от субтипа ШФ и в наибольшей степени проявляются при обострении заболевания [Arolt et al, 2000].

Нами было также показано отсутствие ассоциации между ШФ и rs2069778 полиморфизмом гена *IL2*, который локализован в первом интроне этого гена ([www.snpedia.com/index.php Rs2069778](http://www.snpedia.com/index.php/Rs2069778)). Что касается γ -рецептора IL-2, то при ШФ он вообще не был исследован ни на уровне экспрессии, ни на генетическом, ни на каком-

либо другом уровне. Нами впервые показана его гиперэкспрессия при ШФ. IL-23A также не был исследован при ШФ. Нами впервые установлено, что rs11171806 полиморфизм гена *IL23A*, который локализован в четвертом экзоне этого гена, положительно ассоциирован с ШФ.

Отметим, что нарушения на уровне таких ключевых компонентов семейства воспалительных цитокинов как IL-2, γ -рецептор IL-2 и IL-23A могут приводить к существенным сдвигам в цитокин-индуцируемых сигнальных каскадах, регулирующих и иммунный статус, и процессы нейротрансмиссии, что особенно актуально в случае ШФ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе было проведено исследование при ШФ функционального состояния 10-и генов, кодирующих медиаторы и регуляторы иммунного ответа - транскрипционные факторы E4F1, GATA3 и Tbx21, аннексин-A11, факторы В, Н и I системы комплемента, IL-2, IL-23A и γ -рецептора IL-2, вовлеченные в провоспалительные сигнальные каскады. Это исследование проведено путем сравнительного анализа экспрессии и полиморфизмов отмеченных генов у больных ШФ и ЗЛ (норма). Для трех из исследованных нами генов (*ANXA11*, *IL2*, *IL23A*) показано нарушение их экспрессии при ШФ, а для четырех (*CFB*, *CFH*, *CFI*, *IL23A*) - наличие ассоциации между их однонуклеотидными полиморфизмами и ШФ. На рисунке 3 показано расположение исследованных генов на хромосомной карте человека.

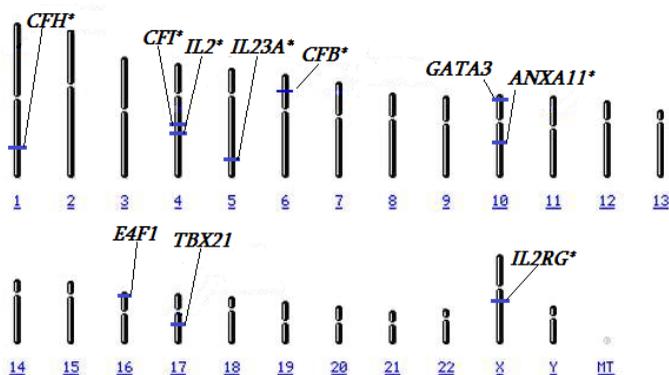


Рисунок 3. Локализация исследованных нами генов на хромосомной карте.

Звездочкой отмечены те гены, функциональное состояние которых при ШФ отлично от нормы, согласно результатам настоящего исследования.

Полученные результаты обобщены на рисунке 4. Они в значительной степени расширяют существующие представления об этиопатогенезе ШФ в целом и, в частности, о молекулярных этиопатомеханизмах, лежащих в основе системных нарушений иммунного статуса организма при ШФ. Так, впервые установлено вовлечение в наблюдаемые при ШФ дисрегуляцию и неконтролируемую гиперактивацию иммунного ответа таких ключевых представителей семейства воспалительных цитокинов, как IL-23A и γ -рецептор IL-2. Впервые показано, что ШФ характеризуется гиперэкспрессией генов

ANXA11, *IL2RG* и гипоэкспрессией гена *IL2* в МНПК, что создает основу для разработки направленных методов коррекции нарушений иммунного ответа при ШФ. Идентифицированы ранее неизвестные «кандидатные гены» ШФ (*CFB*, *CFH*, *CFI*, *IL23A*) и генетические факторы, повышающие и понижающие риск развития ШФ (мутантный аллель полиморфизма rs8002928 гена *CFH* в гомозиготной форме, мутантные аллели полиморфизмов rs424535, rs1061170 гена *CFH*, rs10033900 гена *CFI*, rs11171806 гена *IL23A*, и мутантный аллель полиморфизма rs12614 гена *CFB*).

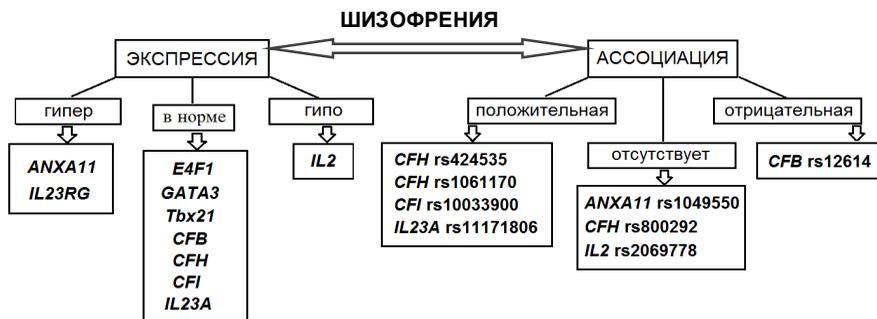


Рисунок 4. Схематическое обобщение результатов настоящего исследования полученных при сравнительном изучении экспрессии и полиморфизмов генов, кодирующих медиаторы и регуляторы иммунного ответа, при ШФ и в норме.

ВЫВОДЫ

1. Лейкоциты хронических больных шизофренией характеризуются гиперэкспрессией генов, кодирующих аннексин-А11 и γ -рецептор интерлейкина-2, гипоэкспрессией гена, кодирующего интерлейкин-2.
2. Функциональные однонуклеотидные полиморфизмы rs2069778 гена *IL2*, rs800292 гена *CFH* и rs1049550 гена *ANXA11* не ассоциированы с шизофренией.
3. Нарушение экспрессии генов, кодирующих аннексин-А11 и интерлейкин-2, при шизофрении не обусловлены функциональными полиморфизмами rs1049550 гена *ANXA11* и rs2069778 гена *IL2*.
4. Уровни экспрессии генов, кодирующих факторы комплемента В, Н и I, интерлейкин-23А, а также транскрипционные факторы Tbx21, GATA3 и E4F1 в лейкоцитах больных шизофренией находятся в пределах нормы.
5. Наследование мутантных аллелей однонуклеотидных полиморфизмов rs1117180 гена *IL23A*, rs424535 и rs1061170 гена *CFH* и rs100339 гена *CFI*, а также гомозиготного по мутантному аллелю полиморфизма rs800292 гена *CFH* генотипа повышает риск развития шизофрении.
6. Наличие мутантных аллелей однонуклеотидных полиморфизмов rs11171806 гена *IL23A*, rs424535, rs1061170 гена *CFH* и rs100339 гена *CFI* в геноме больных шизофренией не влияет на уровни экспрессии кодируемых этими генами белков.
7. Наследование мутантного аллеля однонуклеотидного полиморфизма rs1261 гена *CFB* понижает риск развития шизофрении.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Boyajyan A., Stepanyan A., Avetyan D., **Ghazaryan H.**, Atshemyan S., Zakharyan R., Pirumyan K., Tsakanova G. Genetic variations associated with brain disorders: Focus on synaptic plasticity and apoptosis regulatory genes in schizophrenia, posttraumatic stress disorder and ischemic stroke. // *International Journal of Genetics and Genomics*. - 2014. - V.2, N2. - p. 19-29.
2. **Ghazaryan H.**, Petrek M., Boyajyan A. Chronic schizophrenia is associated with over-expression of the interleukin-2 receptor gamma gene. // *Psychiatry Research*. - 2014. - V.217, N3. - p. 158-162.
3. **Ghazaryan H.K.**, Boyajyan A.S., Gevorgyan A.P., Melkumova M.L. Genetic markers of schizophrenia among immune response mediators. // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2014». - том 2. - с. 220-221.
4. **Ghazaryan H.** Annexin 11 expression pattern in schizophrenia. // *Electronic Journal of Natural Sciences*. - 2013. - V.21, N2. - p. 74-76.
5. **Ghazaryan H.** Expression pattern of selected inflammation related genes in schizophrenia. // *Biological Journal of Armenia*. - 2013. - V.65, N1. - p. 64-65.
6. **Ghazaryan H.**, Petrek M., Gevorgyan A., Melkumova M., Boyajyan A. Expression levels and genetic polymorphisms of complement factors H and B in schizophrenia. // *Armenian Journal of Mental Health*. - 2013. - V.4, N1 (Suppl.). - p.71.
7. **Ghazaryan H.**, Boyajyan A., Zakharyan R., Melkonyan A., Navratilaova Z., Klevcova P., Petrek M. Schizophrenia is associated with over-expression of the interleukin-2 receptor gamma gene. // *Book of Abstracts of the 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, August 22-27.*- 2013.- p.748; published also in **Frontiers in Immunology**.- 2013.- doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00380
8. **Ghazaryan H.**, Boyajyan A., Zakharyan R., Melkonyan A., Navratilaova Z., Klevcova P., Petrek M. Schizophrenia is not associated with changes in blood expression levels of complement factors B, H and I. // *Book of Abstracts of the 15th International Congress of Immunology, Milan, Italy, August 22-27.*- 2013.- p.748. published also in **Frontiers in Immunology**.- 2013.- doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00351
9. Boyajyan A., **Ghazaryan H.**, Stepanyan A., Zakharyan R. Genetic polymorphisms of complement factor H in schizophrenia and ischemic stroke. // *Molecular Immunology*. - 2013. - V. 56, N3. - p.294.
10. **Ghazaryan H.**, Zakharyan R., Melkonyan A., Boyajyan A. Study of the association of schizophrenia with genetic polymorphisms of the complement alternative pathway factors B, H, and I. // *Proceedings of the International young scientists conference «Perspectives for development of molecular and cellular biology-3»*. - 2012. - p. 73-77.
11. **Ghazaryan H.**, Atshemyan S., Zakharyan R., Arakelyan A. Complement factor H functional genetic variant in schizophrenia. // *Proceedings of the conference «Modern trends in the development of biology»*. - 2012. - p. 10-12.

**ԻՄՈՒՆՑԻՆ ՊՍՏԱՄԽԱՆԻ ԿԱՐԳԱՎՈՐԻՉՆԵՐ ԵՎ ՄԻՋՆՈՐԴԱՆՑՈՒԹԵՐ
ԿՈՂԱՎՈՐՈՂ ԳԵՆԵՐԻ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ ՎԷՃԱԿԸ ՇԻՋՈՖՐԵՆԻԱՅԻ ԺԱՄԱՆԱԿ**

ԱՄՓՈՓՈՒԹՅՈՒՆ

Հանգուցային բառեր` տրանսկրիպցիոն գործոններ E4F1, GATA3 և Tbx21, անեքսին-A11, կոմպլեմենտի B, H և I գործոններ, ինտերլեյկին-2, ինտերլեյկին-2-ի Գ-ընկալիչ, ինտերլեյկին-23A, գեների էքսպրեսիա, ֆունկցիոնալ պոլիմորֆիզմներ, շիզոֆրենիա, իմունային պատասխանի խախտում:

Շիզոֆրենիայի (ՇՖ) մոլեկուլազենետիկական հիմքերը և էթիոպաթոմեխանիզմները, նրա զարգացման մեջ գենետիկական և ոչ գենետիկական գործոնների ներդրումն ու փոխազդեցությունն այսօր ինտենսիվ ուսումնասիրվում է շատ գիտական խմբերում ողջ աշխարհում՝ ստացված արդյունքների հիման վրա այս հիվանդության վաղ ախտորոշման և բուժման գործուն արդյունավետ եղանակների մշակման նպատակով:

Մի շարք փորձարարական և կլինիկական տվյալներ, այդ թվում և մեր լաբորատորիայում ստացված, վկայում են, որ ՇՖ-ի ժամանակ դիտարկվող պաթոֆիզիոլոգիական գործընթացներում ներգրավված են իմունային պատասխանի խախտումներ՝ ներառյալ բորբոքային և աուտոիմունային ռեակցիաների զարգացումը, ինչպես գլխուղեղում, այնպես էլ համակարգային մակարդակում: Ցույց է տրված, որ այս գործընթացները սերտ փոխազդեցության մեջ են գտնվում ՇՖ-ի համար բնորոշ նեյրոնալ պլաստիկության, սինապտիկ տրանսմիսիայի և ճանաչողական ֆունկցիաների խանգարումների հետ: Սակայն նշված խախտումներում գենետիկական և ոչ գենետիկական գործոնների մասնակի ներդրումը դեռևս պարզաբանության կարիք ունի, ինչը զգալիորեն արգելակում է ՇՖ-ի էթիոպաթոմեխանիզմներին վերաբերվող գիտելիքների զարգացման առաջընթացը:

Տվյալ աշխատանքի նպատակն էր ուսումնասիրել իմունային պատասխանի կարգավորիչներ և միջնորդանյութեր կողավորող գեների ֆունկցիոնալ կարգավիճակը (էքսպրեսիան և ֆունկցիոնալ պոլիմորֆիզմները) ՇՖ-ի ժամանակ՝ համեմատած նորմալի հետ: Այս նպատակի շրջանակներում մեր կողմից ուսումնասիրվել են. (1) հարբոբոքային ազդանշանային համալիրներում և իմունային պատասխանի կարգավորման մեջ ներգրավված E4F1, GATA3 և Tbx21 տրանսկրիպցիոն գործոններ կողավորող E4F1, GATA3 և TBX21 գեները, (2) ANXA11 գենը, որը կողավորում է նեյտրոֆիլների կողմից միջնորդված աուտոիմունային և բորբոքային ռեակցիաների էֆեկտոր՝ անեքսին-A11 սպիտակուցը, (3) CFB, CFH և CFI գեները, որոնք կողավոր-

րում են իմունային պատասխանի կարևորագույն միջնորդանյութի՝ կոմպլեմենտի համակարգի B, H և I գործոնները, (4) *IL2*, *IL23A* և *IL2RG* գեները, որոնք կողմնակցում են բորբոքային ցիտոկիններ՝ ինտերլեյկին (IL)-2, IL-23α և IL-2-ի Կ-ընկալիչը:

Հետազոտությունների ընթացքում համեմատվել են վերը նշված գեների էքսպրեսիայի մակարդակները ծայրամասային արյան լեյկոցիտներում և ֆունկցիոնալ եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմները ՇՖ-ով տառապող և առողջ անձանց մոտ: Ընհանուր առմամբ աշխատանքում ներգրավված էին ՇՖ-ի պարանոթի դալ ձևով տառապող 225 քրոնիկ հիվանդներ և նրանց տարիքով ու սեռով համապատասխանող նույն թվով առողջ անհատներ: Աշխատանքում օգտագործվել են մոլեկուլարբջջային կենսաբանության մի շարք ժամանակակից պրեպարատիվ և անալիտիկ եղանակներ, այդ թվում հետազոտության սուբյեկտների արյունից գենոմային ԴՆԹ-ի անջատումը, արյան լեյկոցիտներից ՌՆԹ-ի անջատումը, թիրախ գեների կլոնավորումը, ռեալ ժամանակում քանակական պոլիմերազային շղթայական ռեակցիայի (qRT-PCR) միջոցով նրանց էքսպրեսիայի մակարդակների որոշումը, հաջորդականության նկատմամբ յուրատիպ PCR-ի (PCR-SSP) միջոցով գեների եզակի նուկլեոտիդային պոլիմորֆիզմների ուսումնասիրությունը: Տվյալները վիճակագրական վերլուծությունը իրականացվել է մի շարք պարամետրիկ և ոչ պարամետրիկ վիճակագրության եղանակների կիրառմամբ:

Ստացված տվյալները զգալիորեն լայնացնում են ինչպես ՇՖ-ի էթիոպաթոգենեզի վերաբերյալ, այնպես էլ այս հիվանդության ժամանակ դիտվող իմունային կարգավիճակի համակարգային խախտումների հիմքում ընկած մոլեկուլային էթիոպաթոմեխանիզմների վերաբերյալ գիտելիքները: Այսպես, առաջին անգամ ցույց է տրված, որ ՇՖ-ի ժամանակ դիտվող իմունային պատասխանի ապակարգավորման և չվերահսկվող գերակտիվացման գործընթացներում ներգրավված են բորբոքային ցիտոկինների ընտանիքի այնպիսի հանգուցային ներկայացուցիչներ, ինչպիսիք են *IL-23A*-ն և *IL-2*-ի Կ-ընկալիչը: Նույնպես առաջին անգամ ցույց է տրված, որ ՇՖ-ի համար բնորոշ է *ANXA11* և *IL2RG* գեների գերէքսպրեսիան և *IL2* գենի թերէքսպրեսիան ծայրամասային արյան բջիջներում, ինչը կարող է հիմք հանդիսանալ ՇՖ-ի ժամանակ դիտվող իմունային պատասխանի խախտումների շտկման եղանակների մշակման համար: Նույնականացված են մինչ այժմ անհայտ ՇՖ-ի «թեկնածու գեները» (*CFB*, *CFH*, *CFI*, *IL23A*) և այն գենետիկական գործոնները, որոնք բարձրացնում կամ ցածրացնում են այս հիվանդության զարգացման ռիսկը (*CFH* գենի rs424535, rs1061170, *CFI* գենի rs10033900, *IL23A* գենի rs11171806 պոլիմորֆիզմների մուտանտ ալելները, *CFH* գենի rs800292 պոլիմորֆիզմի մուտանտ ալելը՝ հոմոզիգոտ վիճակում և *CFB* գենի rs12614 պոլիմորֆիզմի մուտանտ ալելը, համապատասխանաբար):

Ghazaryan Hovsep Karapeti

FUNCTIONAL STATE OF GENES, ENCODING REGULATORS AND MEDIATORS OF THE IMMUNE RESPONSE, IN SCHIZOPHRENIA

SUMMARY

Keywords: transcription factors E4F1, GATA3 and Tbx21, annexin-A11, complement factors B, H and I, interleukin-2, interleukin-23A, interleukin-2 receptor γ chain, gene expression, functional polymorphisms, schizophrenia, immune response alterations.

Molecular and genetic basics and etiopathomechanisms of schizophrenia (Sch), contribution of genetic and non-genetic factors to its development and their interrelations have been intensively studied today by many research teams all over the world in order to develop on the base of the obtained results the efficient valid methods for early diagnostics and treatment of this disorder.

A number of experimental and clinical data, including those obtained in our laboratory, suggest the involvement in pathophysiological processes detected in Sch the alterations in the immune response including development of inflammatory and autoimmune reactions in the brain and on systemic level. It has been shown that these alterations are tightly interrelated with defects in neuronal plasticity, synaptic connectivity and cognitive deficit specific for Sch. However, part contribution of genetic and non-genetic factors to these alterations has not been cleared yet, limiting progress in development of knowledge relative to etiopathomechanisms of Sch.

The objective of the present work was to study in Sch in comparison to norm a functional state (expression and functional polymorphisms) of genes encoding regulators and mediators of the immune response including (1) *E4F1*, *GATA3* and *TBX21* genes encoding transcription factors E4F1, GATA3 and Tbx21 involved in inflammatory signal-lig pathways and regulation of the immune response; (2) *ANXA11* gene encoding the effector of neutrophil-mediated autoimmune and inflammatory reactions - annexin-A11 protein; (3) *CFB*, *CFH* and *CFI* genes encoding factors B, H and I of the complement system -the major mediator of the inflammatory immune response (4) *IL2*, *IL23A* and *IL2RG* genes encoding inflammatory cytokines interleukin(IL)-2, IL-23 α , interleukin-2 receptor γ chain.

During the study we performed comparative evaluation of the expression levels of the above mentioned genes in peripheral blood leukocytes and their functional single nucleotide polymorphisms in Sch-affected and healthy subjects. In total, 225 patients with chronic

paranoid form of Sch and the same number of age- and sex-matched healthy subjects were enrolled in this study. A number of contemporary preparative and analytical methods of molecular and cellular biology were used in this study including isolation of genomic DNA and peripheral blood leukocytes from the blood of study subjects, isolation of RNA from these cells, cloning of target genes, determination of their expression levels by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and investigation of their single nucleotide polymorphisms by sequence-specific PCR (SSP-PCR). Data was analyzed by a number of parametric and nonparametric statistical methods.

The results obtained are broadening both the general knowledge on Sch etiopathogenesis and on etiopathomechanisms of Sch-associated systemic disorder in the immune system. Thus, for the first time, the involvement of such key representatives of the inflammatory cytokine family as IL-23A and interleukin-2 receptor γ chain in deregulation and uncontrolled hyperactivation of the immune response in Sch has been shown. Also, for the first time, it has been shown that Sch is characterized by hyperexpression of *ANXA11* and *IL2RG* genes as well as by hypo expression of *IL2* gene in peripheral blood leukocytes. This observation may represent a basis for development of targeted methods of correction of the changes in the immune response detected in Sch. Also we identified new candidate genes of Sch (*CFB*, *CFH*, *CFI*, *IL23A*) and genetic factors that increase or diminish the risk of developing Sch (mutant alleles of rs424535 and rs1061170 polymorphisms of *CFH* gene, rs10033900 polymorphism of *CFI* gene, rs11171806 polymorphism of *IL23A* gene, homozygous variant of mutant allele of rs800292 polymorphism of *CFH* gene and mutant allele of rs12614 SNP of *CFB* gene respectively).

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Anatoly', written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.