

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной
медицины»

На правах
рукописи

Липина Татьяна Викторовна

Вклад точечной мутации гена *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1)
в патогенез шизофрении: экспериментальное исследование

03.03.01 – Физиология

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор биологических наук,
Амстиславская Тамара Геннадьевна

НОВОСИБИРСК - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

Глава 1. ВВЕДЕНИЕ	5
Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
2.1. Этиология шизофрении	12
2.1.1. Генетика шизофрении	12
2.1.2. Патогенные факторы окружающей среды	15
2.2. Теории шизофрении	18
2.2.1. Дофаминовая теория	18
2.2.2. Глутаматная теория	22
2.2.3. Теория дисбаланса возбуждательных и тормозных нейронов	25
2.2.4. Теория нейроразвития	27
2.3. DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia-1)	31
2.3.1. Взаимосвязь гена <i>DISC1</i> с психическими заболеваниями	31
2.3.2. Функции DISC1 протеина и его интерактома	33
2.3.2.а. Внутриклеточные функции	34
2.3.2.б. Сигнальные пути и синаптическая пластичность	36
2.3.2.в. Нейроразвитие	38
2.4. Экспериментальные исследования шизофрении на моделях животных	40
2.4.1. Основные критерии модели шизофрении	40
2.4.2. Нейробиологические эндофенотипы шизофреноподобного поведения	40
2.4.3. Экспериментальные модели шизофрении	45
2.5. Биомаркеры шизофрении и молекулярные мишени для создания антипсихотиков	53
Заключение к Главе 2	58
Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
3.1. Экспериментальные животные	60
3.2. Поведенческие тесты	61
3.2.1. Эмоциональное поведение	61
3.2.2. Социальное поведение	62
3.2.3. Когнитивное поведение	63
3.3. Биохимические методы	66
3.3.1. Вестерн блоттинг	66
3.3.2. Коиммунопреципитация	67
3.3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография	68
3.3.4. Определение плотности высокочувствительных дофаминовых рецепторов 2го типа - D ₂ ^{high}	68

3.3.5. Определение цитокинов иммуноферментным анализом ELISA	69
3.3.6. Анализ экспрессии генов с помощью микрочипов	70
3.4. Микродиализ <i>in vivo</i>	71
3.5. Иммуногистохимия	72
3.6. Фармакологические препараты	73
3.7. Статистическая обработка	74
Глава 4. ФЕНОТИПИРОВАНИЕ DISC1 МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ	75
4.1. Создание двух генетических линий мышей с мутациями во 2м экзоне гена <i>DISC1</i>	75
4.2. Сравнительный анализ поведенческих эндофенотипов 31L/31L и 100P/100P мутантных мышей	76
4.3. Фармакологические эффекты антидепрессантов и антипсихотиков на поведение 31L/31L и 100P/100P линий мышей	82
Заключение к Главе 4	85
Глава 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ 100P/100P	86
5.1. Повышенная фармакологическая чувствительность 100P/100P линии к амфетамину	86
5.2. Содержание моноаминов в отделах головного мозга	87
5.3. Уровень межклеточного дофамина в стриатуме в ответ на амфетамин (0.5 мг/кг)	88
5.4. Плотность дофаминовых рецепторов D2 ^{high} в стриатуме	89
5.5. Эффекты галоперидола (0.8 мг/кг) на гиперактивность, вызванной амфетамином	90
5.6. Взаимодействия между DISC1-L100P протеина с PDE4B, GSK-3 и D2 рецепторами	91
5.7. Эффекты фармакологического и генетического ингибирования GSK-3 на дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мышей	94
5.8. Эффекты коррекции усиленных взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами с помощью TAT-D2R пептида на шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей	100
Заключение к Главе 5	102
Глава 6. ПАТОГЕННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 100P⁺ МУТАЦИИ С МАТЕРИНСКОЙ ИММУННОЙ АКТИВАЦИЕЙ (МИА): ГЕН X СРЕДА ГИБРИДНАЯ МОДЕЛЬ ШИЗОФРЕНИИ	102
6.1. Проявление шизофреноподобного поведения у 100P ⁺ x МИА мышей	103
6.2. Уровень интерлейкина-6 в головном мозге эмбрионов 100P ⁺ x МИА мышей	106
6.3. Превентивный эффект антител к интерлейкину-6 на проявление шизофреноподобных эндофенотипов у 100P ⁺ x МИА мышей	106
Заключение к Главе 6	108

Глава 7. ПОИСК И ВАЛИДАЦИЯ НОВЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ВАЛЬПРОАТА НА ШИЗОФРЕННОПОДОБНЫЕ ЭНДОФЕНОТИПЫ 100P/100P МЫШЕЙ	109
7.1. Проявление шизофреноподобных эндофенотипов у 100P/100P мышей в возрасте 16 недель, но не 8 недель	109
7.2. Превентивная эффективность вальпроата на шизофреноподобные эндофенотипы 100P/100P мышей	111
7.3. Эффекты DISC1-L100P мутации, вальпроата и их взаимодействия на уровень экспрессии генов в структурах головного мозга и идентификация липокалина-2 (Lcn2) как гена-кандидата для ранней диагностики и создания превентивной терапии	114
7.4. Повышенное количество глиальных клеток в области рострального миграционного тракта у 100P/100P мышей	117
7.5. Взаимосвязь между экспрессией Lcn2, количеством глиальных клеток в области рострального миграционного тракта и проявлением шизофреноподобных эндофенотипов у 100P/100P мышей	120
Заключение к Главе 7	127
Глава 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	124
8.1. Генетическая линия мышей 100P/100P как модель шизофрении	125
8.2. Вклад DISC1-L100P интерактома в дофаминергическую теорию шизофрении	130
8.3. Вклад DISC1-L100P мутации в теорию нейроразвития шизофрении	136
8.4. Вклад DISC1-L100P интерактома в разработку биомаркеров шизофрении и создание антипсихотиков нового поколения	140
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	146
ВЫВОДЫ	148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	149
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	201
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	204

Глава 1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Шизофрения является хроническим психическим заболеванием, затрагивающим ~ 1% населения во всем мире, и характеризующимся нарушением когнитивных и эмоциональных функций. Выделяют позитивные, негативные и когнитивные симптомы шизофрении (АРА, 2013). Позитивные симптомы заболевания проявляются как визуальные и /или слуховые галлюцинации, бред, паранойя, и нарушение мышления. Негативные симптомы включают социальное отчуждение, апатию, ангедонию, алогию и поведенческую персеверацию. Для когнитивных симптомов шизофрении характерно нарушение исполнительных функций головного мозга, ухудшение рабочей памяти, неспособность удерживать внимание, а также когнитивная ригидность. Средний возраст возникновения шизофрении у мужчин - 18-25 лет, и у женщин — 23-30 лет (Tandon et al., 2009). Шизофрению принято считать неизлечимым заболеванием, которое зачастую принимает затяжной характер. Поскольку причины возникновения шизофрении до конца не изучены, основная терапия направлена на купирование существующих симптомов. Около 80% больных шизофренией способны поддерживать свою жизнедеятельность при постоянном воздействии антипсихотиков, и 20% пациентов необходима долгосрочная госпитализация.

Анализ генетической архитектуры шизофрении и механизмов её наследуемости доказал полигенный характер заболевания (Lewis, Levitt, 2002; Howes et al., 2017). В патогенез шизофрении критичный вклад приносят взаимодействия определённых генетических элементов с психопатогенными факторами окружающей среды, что в целом нарушает формирование мозга и способствует в дальнейшем проявлению симптомов шизофрении, которые, как правило, не возникают до юношеского периода жизни (Вика, Fan 1999; Lewis, Levitt, 2002). Патологические механизмы на ранней стадии развития, вовлечённые в долговременные процессы патогенеза шизофрении, до сих пор остаются неизученными. Одной из причин является отсутствие надежных биомаркеров для ранней диагностики шизофрении и трудоемкость проведения долговременных клинических исследований до начала проявления симптомов шизофрении. Только в последние годы стали появляться первые статьи с высококачественной визуализацией головного мозга в процессе нейроразвития - до и после возникновения шизофрении (Zalesky et al., 2015). В качестве превентивной терапии психозов и шизофрении был предложен вальпроат как многофункциональный препарат с более щадящим действием по сравнению с антипсихотиками (Lambert et al., 2016). Отсутствие подходящих экспериментальных

моделей шизофрении, которые бы соответствовали гипотезе нейроразвития, также замедляет прогресс в данном направлении. Хотя существует ряд моделей с селективным разрушением определённых участков мозга на ранней стадии развития, которые приводят к проявлению шизофреноподобного поведения после полового созревания (Moore et al., 2006; Tseng, 2007), однако такой подход не моделирует в полной мере этиологию шизофрении, поскольку не учитывается генетический компонент.

Выявляют около 130 генов-кандидатов, связанных с предрасположенностью к шизофрении, из которых только несколько подтверждены независимыми исследованиями (Ross et al., 2006). Так, *DISC1* (Disrupted-In-Schizophrenia-1) ген был картирован на 1й хромосоме при цитогенетическом анализе транслокации между 1 и 11 хромосомами (t1:11) среди членов шотландской семьи больных шизофренией, депрессией и биполярным расстройством (St Clair et al., 1990; Millar et al., 2000). Затем, независимые группы исследователей выявили генетическую ассоциацию поврежденного гена *DISC1* с шизофренией в семьях из Финляндии (Ekelund et al., 2001; 2004), Шотландии (Macgregor et al., 2004), Великобритании (Hamshere et al., 2005). Многочисленные исследования обнаружили ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов гена *DISC1* с шизофренией на различных популяциях (Liu et al., 2006, обзор Bradshaw and Porteous, 2012, Thomson et al., 2013). Была создана генетическая линия мышей с потерей С-конца *DISC1*, моделирующей укороченную изоформу *DISC1* размером ~ 75 кДа при межхромосомной транслокации у людей (Li et al., 2007). Данная линия мышей продемонстрировала шизофреноподобные эндотипы вместе с депрессивно-подобным поведением на фоне упрощения дендритных разветвлений нейронов в гиппокампе. Следует отметить, что на начальном этапе, исследования *DISC1* были в основном сосредоточены на функциональной роли С-конца *DISC1*, поскольку место межхромосомной транслокации t1:11 приходится на 9 экзон гена *DISC1*, кодирующий С-конец протеина, в то время как функциональная роль N-конца *DISC1* оставалась неизученной. В основном были получены доказательства, что С-конец *DISC1* играет важную роль в нейроразвитии. Так, *DISC1-S704* полиморфизм, ассоциированный с шизофренией у людей, подавляет нейрональную миграцию в коре головного мозга в процессе нейроразвития (Singh et al., 2011). Кроме того, обнаружен повышенный уровень *DISC1* изоформы размером 75-85 кДа в клеточных ядрах у больных шизофренией (Sawamura et al., 2005). Однако была найдена генетическая ассоциация между шизофренией, шизоаффективным расстройством и дефицитом рабочей памяти для

пациентов с гаплотипами, охватывающими 2 экзон *DISC1* (Cannon et al., 2005; Hennah et al., 2005; Maeda et al., 2006). Также было выявлено взаимодействие между С-концом *DISC1* и фосфодиэстеразой 4го типа (PDE4) (Millar et al., 2005). PDE4 вместе с гликоген синтаз киназой-3 (GSK-3) (Beaulieu et al., 2012) являются внутриклеточными регуляторами активности дофаминовых рецепторов 2го типа (D2), которые лежат в основе дофаминовой теории шизофрении (Snyder, 1976; Howes, Kapur, 2009). Установлено, что *DISC1* активно взаимодействует с другими протеинами, создавая межбелковую сеть из 127 протеинов, включающих 158 взаимодействий (Camargo et al., 2007). Учитывая, что шизофрения является полигенным психическим заболеванием и риск развития данного расстройства определяется взаимодействиями между генетической предрасположенностью и средой, а также взаимодействиями на геномном и протеиновом уровнях, одним из новых подходов изучения механизмов шизофрении является выявление вклада нарушенных межбелковых взаимодействий в патогенез шизофрении (Nicodemus et al., 2010). Для реализации такого подхода целесообразно исследование полиморфизма *DISC1*, нарушающего взаимодействия определённых протеинов с *DISC1* на уровне *in vivo* модели. Однако, на момент инициации данного исследования, экспериментальных *in vivo* моделей для изучения вклада межбелковых взаимодействий N-конца *DISC1* в механизмы шизофрении не существовало. Эти данные послужили основанием для гипотезы, что генетическая модификация 2го экзона гена *DISC1* у мышей, кодирующего N-конец *DISC1*, позволит оценить его вклад в межбелковые взаимодействия и патогенез шизофрении на экспериментальной модели *in vivo*. Более того, 2й экзон *DISC1* является наиболее длинным и, следовательно, представляет собой оптимальную мишень для поиска точечной мутации, вызванной химическим мутагеном ENU (N-ethyl N-nitrosourea), широко используемого в экспериментальном подходе от «гена к поведению» (Coghill et al., 2002).

В связи с вышеизложенным, **целью** данной работы явилось исследование вклада гена *DISC1* с точечной мутацией во 2^м экзоне, модифицирующей N-конец белка, в механизмы шизофрении на экспериментальной *in vivo* модели мышей для выявления новых биомаркеров и терапевтических мишеней.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать генетические линии мышей с измененным геном *DISC1* путем точечных мутаций во 2м экзоне и сравнить линии поведенческими методами для дальнейшего выявления шизофреноподобных характеристик;

2. Определить биохимические изменения в головном мозге, вызванные мутацией (*DISC1* Rgsc¹³⁹⁰), селективно приводящей к шизофреноподобному поведению у мышей линии 100P/100P, включая показатели дофаминергической системы и характеристики взаимодействия *DISC1* с PDE4B, GSK-3 белками и D2 рецепторами;
3. Оценить антипсихотические эффекты ингибиторов PDE4B и GSK-3, а также пептида TAT-D2per, разрывающего межбелковые взаимодействия между *DISC1* и D2 рецепторами;
4. Оценить взаимодействие между генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению (100P⁺) и фактором материнской иммунной активации для дальнейшей валидации патогенности *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ мутации, а также оценить вклад интерлейкина-6 в генез данного типа патологического поведения;
5. Исследовать динамику возникновения эндофенотипов шизофреноподобного поведения у мышей линии 100P/100P, превентивную эффективность вальпроата и молекулярную мишень, опосредующую данный эффект.

Научная новизна полученных результатов

Впервые создана генетическая линия мышей с точечной мутацией во 2м экзоне гена *DISC1*, приводящей к замене лейцина на пролин в позиции 100 аминокислоты протеина *DISC1* (линия *DISC1*-L100P; 100P/100P). Установлены поведенческие маркеры шизофреноподобного типа у 100P/100P мутантных мышей: гиперактивность, нарушения престаимпульного торможения, латентного торможения и дефицит рабочей памяти. Показана избирательная чувствительность данных характеристик к антипсихотику, клозапину.

Оценка анатомических изменений головного мозга с применением магнитно-резонансной томографии выявила снижение объёма мозга на 13%.

Данные биохимического анализа обнаружили пониженное связывание мутированного *DISC1*-L100P протеина с фосфодиэстеразой-4B (PDE4B) и гликоген-синтаз киназой-3 (GSK-3), вместе с повышенным взаимодействием с дофаминовыми рецепторами 2го типа (D2). Сниженное взаимодействие *DISC1*-L100P с GSK-3 сопровождалось низким уровнем фосфорилирования GSK-3, свидетельствуя о повышенной ферментативной активности GSK-3. Фармакологическое и генетическое ингибирование GSK-3 нормализовали шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей. Впервые выявлено синергетическое взаимодействие между фармакологическими ингибиторами PDE4 и GSK-3. С учетом того, что GSK-3 активация

зависит от стимуляции D2 рецепторов, было предположено, что DISC1 регулирует функциональность D2 рецепторов и, соответственно, функционирование дофаминовой системы головного мозга. Впервые обнаружено наличие функционального взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами. Показано, что взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами усилены как в постмортальных образцах стриатума больных шизофренией, так и на генетической модели шизофрении - 100P/100P линии мышей.

Установлены антипсихотические свойства пептида, размыкающего взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами, корректируя шизофреноподобное поведение у 100P/100P мышей.

Показано взаимодействие между генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению у гетерозиготных 100P⁺ мышей и внутриутробной материнской иммунной активацией (МИА), а также вклад провоспалительного цитокина, интерлейкина-6 (ИЛ-6), в патогенез шизофреноподобного поведения на гибридной модели 100P⁺ x МИА, свидетельствуя о патогенности 100P мутации.

На генетической модели 100P/100P установлена отставленная манифестация шизофреноподобного поведения в возрасте 12-16 недель. Хроническое введение вальпроата до начала проявления шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей предотвращало патологическое поведение. По данным транскриптомного анализа отделов головного мозга идентифицирован глиатрансмиттер липокалин-2 (Lcn2), вовлечённый в эффекты 100P мутации, вальпроата и их совместном взаимодействии. Установлены достоверные корреляционные сопряжения уровней экспрессии Lcn2 с количеством астроцитов и сенсорно-моторной фильтрацией информации у 100P/100P генетической линии мышей. Данные корреляционного анализа указывают, что Lcn2 может являться молекулярным индексом ранней диагностики шизофрении, а также терапевтической мишенью для создания превентивной терапии данного заболевания.

Теоретическая и практическая ценность работы

Теоретическая и практическая значимость работы определяется доказательством соответствия генетической линии 100P/100P критериям модели шизофрении, возможности её использования для исследований молекулярно-клеточных и нейробиологических механизмов шизофрении, связанных с нарушением нейроразвития, а также дофаминергической системы головного мозга. Использование 100P/100P генетической модели шизофрении также полезно для оценки эффективности терапевтических воздействий как в целях предотвращения развития заболевания, так и его лечения. Выявленные в работе эффекты PDE4, GSK-3 блокаторов и пептида TAT-D2per демонстрируют терапевтический потенциал

данных соединений в качестве будущих антипсихотических препаратов. Разработана гибридная модель шизофреноподобного поведения, сочетающая в себе генетический и средовой факторы (100P/+ x МИА), которая также может быть использована в доклинических исследованиях шизофрении. Выявленная взаимосвязь между Lcn2, уровнем астроцитов и проявлением шизофреноподобного поведения на генетической модели 100P/100P указывает на важность нейроглиальных взаимодействий в патогенезе данного заболевания, а Lcn2 может быть предложен для дальнейших исследований в области разработки биомаркеров для ранней диагностики шизофрении и молекулярных мишеней для создания превентивной терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Генетическая линия мышей 100P/100P с точечной мутацией *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ во 2м экзоне гена *DISC1*, созданная при выполнении данной работы, соответствует основным критериям экспериментальной модели шизофрении, согласно этиологии; сходству симптомов; нейробиологическим изменениям и терапевтическому ответу на антипсихотики.
2. Проявление шизофреноподобного поведения у 100P/100P линии мышей происходит на фоне гиперактивации дофаминергической системы головного мозга, сопровождающейся увеличением: чувствительности к амфетамину, плотности высокочувствительных дофаминовых рецепторов D2 (D2^{high}); взаимодействия DISC1-L100P с D2 рецепторами.
3. Нарушение взаимодействий между DISC1-L100P протеина с GSK-3, PDE4B и D2 рецепторами вовлечено в биохимические механизмы шизофреноподобного поведения. Коррекция повышенной активности GSK-3, PDE4B, а также усиленных взаимодействий между DISC1-L100P и D2 рецепторами, оказывает антипсихотический эффект на шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей.
4. Материнская иммунная активация посредством провоспалительного цитокина интерлейкина-6 (ИЛ-6) опосредует шизофреноподобное поведение у гетерозиготных мышей 100P/+.
5. Глиатрансмиттер липокалин-2 (Lcn-2) вовлекается в нейроглиальные механизмы шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей на ранней стадии развития и в превентивный эффект вальпроата.

Апробация результатов

Результаты, полученные при выполнении диссертационного исследования, представлены и обсуждены на: 10й международной конференции по биоинформатике

геномной регуляции и структурной\системной биологии (BGRS-2016, Новосибирск, Россия, 2016); XII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Россия, 2016); 14м международном конгрессе по исследованиям шизофрении (Флорида, США, 2013); международной конференции сообщества «Стресс и поведение» (Петербург, Россия, 2013); международной конференции “NeuroDevNet Brain Development” (Торонто, Канада, 2012); международной конференции “Society for Neuroscience” (Вашингтон, США, 2011; Чикаго, США, 2009); международной конференции “DISC1-2010” (Эдинбург, Шотландия, 2010); международной конференции “Winter Brain Conference” (Солт-Лэйк Сити, США, 2009); международной конференции «Neurons and Brain Disease» (Торонто, Канада, 2007).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 15 статей в лицензируемых журналах, 3 главы в книгах, по теме диссертации издана 1 книга под редакцией автора.

Структура и объём работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащей 567 источника. Работа изложена на 219 страницах машинописного текста, содержит 7 таблиц, 45 рисунков и 1 приложения.

Личный вклад автора

В цикле исследований, составляющих диссертационную работу, автору принадлежит решающая роль в выборе направления исследований, разработке экспериментальных подходов, в анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, личный вклад автора заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования – от постановки задачи и проведения экспериментов, до анализа, обсуждения и оформления всех полученных результатов.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность научному консультанту д.б.н. Амстиславской Т.Г. за поддержку и помощь в написании диссертации. С особой признательностью автор благодарит научных сотрудников Научно-Исследовательского Института им. Люненфельда-Таненбаума и Университета г. Торонто за плодотворную совместную работу: проф. Джона Родера – за поддержку и обсуждение научных результатов; к.б.н. Стивена Клапкота – за инициацию сотрудничества с биоресурсом RIKEN; проф. Майлса Хуслей – за оценку межбелковых взаимодействий DISC1 x PDE4B, используя НЕК293 клеточную линию; проф. Альберта Вонга – за помощь в проведении

транскриптомного анализа; проф. Фэнг Лью и к.б.н. Шупенга Ли – за оценку межбелковых взаимодействий и создание пептида, размыкающего DISC1xD2 межбелковые взаимодействия; проф. Джеймса Вудгета и к.б.н. Оксану Кайданович-Бейлин – за помощь с анализом DISC1 x GSK-3 межбелковых взаимодействий; проф. Ану Мартинез – за предоставление фармакологического GSK-3 блокатора и обсуждение научных результатов; проф. Ину Вейнер – за обсуждение результатов, полученных методом латентного торможения.

Глава 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Этиология шизофрении

Шизофрения является полиморфным психическим расстройством, характеризующимся: позитивными симптомами (галлюцинации и бред); негативными симптомами (пониженная мотивация, ангедония) и специфическими когнитивными нарушениями (Снежневский, 1985), которые принято считать основными симптомами данного заболевания (Ross et al., 2006). Шизофрения рассматривается как сложное полигенное расстройство, поскольку в его патогенез критичный вклад приносят взаимодействия определённых генетических элементов с психопатогенными факторами окружающей среды, что в целом нарушает формирование мозга и способствует в дальнейшем проявлению симптомов шизофрении, которые, как правило, не возникают до юношеского периода жизни (Lewis, Levitt, 2002). Следовательно, более глубокое понимание функций генов, генетических путей и их взаимодействия с экологическими стрессорами в сочетании с нейровизуализацией как на молекулярно-клеточном уровне, так и на уровне функциональности головного мозга пациентов, улучшат наше понимание этиологии и патогенеза шизофрении.

2.1.1. Генетика шизофрении

Генетический анализ помогает понять, насколько болезнь формируется за счет генов по сравнению с другими факторами. Важно учитывать способ, оценивающий влияние генов на фенотип. В целом, используют два основных подхода для понимания генетической компоненты шизофрении: оценка наследственности и генетической архитектуры шизофрении.

Наследуемость шизофрении

Наследственность является математической оценкой проявления разнообразия фенотипа, что объясняется генетической изменчивостью. Однако наследственность не оценивает количественный вклад генов в проявления фенотипа; скорее, она отражает относительный вклад генетических по сравнению с негенетическими факторами в определённый фенотип. Наследственность оценивается путем сравнения подверженности определённому признаку (шизофрения, например) среди родственников (Москаленко и др., 1981; DeFries, Fulker 1985). Исследования близнецов оказались бесценным материалом для оценки наследуемости, поскольку такой анализ позволяет вычленить влияние специфических факторов окружающей среды на фоне одинаковых геномов (Gielen et al., 2008). Наличие одного и того же фенотипа (конкордантность) у монозиготных (МЗ) и дизиготных (ДЗ) близнецов оценивает генотипическую изменчивость. Конкордантность шизофрении среди МЗ отмечается на уровне 41-65%, в то время как

данный показатель среди ДЗ в пределах от 0-28% (Cardno and Gottesman, 2000; Sullivan et al., 2003). Так как ДЗ близнецы примерно имеют половину генетического разнообразия от неродственных индивидуумов, а МЗ близнецы имеют одинаковые геномы, то наследственность может быть рассчитана как удвоенная разница между конкордантностью (r) среди МЗ и ДЗ близнецов [наследственность = $2(r(MZ) - r(DZ))$]. Таким образом, наследуемость шизофрении на основе исследований близнецов составляет 81% (Cardno, Gottesman, 2000; Sullivan et al., 2003). В то время как оценка наследуемости на основе семейного анализа составляет 64-67% (Gottesman, 1991; Lichtenstein et al., 2009), что может быть связано с увеличением разнообразия среды. Следовательно, анализ наследуемости шизофрении доказывает, что это наследственное нервно-психическое расстройство, и гены играют важнейшую роль в патогенезе заболевания.

Высокая наследуемость шизофрении указывает на то, что геном содержит информацию, которая в значительной степени объясняет причины заболевания. Однако, анализ полногеномных ассоциаций (GWAS – Genome-Wide Association Studies) выявил, что вклад генома в проявление шизофрении составляет около 20-40% (Lee et al., 2012; International Schizophrenia Consortium, 2009; Ripke et al., 2013), поэтому был введён термин «потерянная наследуемость» для объяснения такого несоответствия. Частично феномен «потерянной наследуемости» может быть объяснён эпигенетическими изменениями структуры ДНК и модификациями хроматина, изменяющих генетическую экспрессию без изменений нуклеотидной последовательности ДНК.

Генетическая архитектура шизофрении

В настоящее время существует достаточное количество данных по генетическому полиморфизму, связанного с риском заболевания шизофренией, что позволяет создать эмпирическое представление о генетической архитектуре шизофрении (Kim et al., 2011; Sullivan et al., 2012; Visscher et al., 2012). Шизофрения является высоко полигенным расстройством, с частотой встречаемости среди населения всего мира ~ 1%. В этиологию шизофрении также вовлечен редко-встречаемый генетический полиморфизм, с частотой < 0,1%, возникший в результате мутаций *de novo*. Оценка количества влияния того или иного гена на проявление фенотипов шизофрении основано на пенетрантности, которая отражает фенотипическое проявление аллеля в популяции. Так, например, при полной пенетрантности фенотип проявляется в 100% случаях при наличии аллеля в пределах популяции.

Гены могут оказывать *аддитивный* эффект на фенотипы шизофрении, когда каждый аллель приносит определённый риск, или *мультипликативный* эффект, когда необходимо наличие определенного количества или расположения локусов, чтобы

достичь порогового значения для появления риска заболевания. Аддитивная модель генетических взаимодействий не объясняет генетику шизофрении (Jones et al., 2005; Risch et al., 2006; Wray et al., 2010). Таким образом, генетическая архитектура шизофрении, вероятно, включает в себя тысячи аллелей, которые *мультипликативно* взаимодействуют между собой и очень восприимчивы к генетическому фону, плейотропии (множественное проявление гена) и воздействию окружающей среды. Здоровые люди, вероятно, являются носителями сравнительно небольшого количества аллелей риска, в то время как вероятность заболевания шизофренией резко возрастает у людей, несущих аллели риска, превышающих пороговое значение. Следовательно, можно предположить, что часто встречаемый один аллель риска вряд ли сможет оказать существенный эффект на проявление шизофрении, в то время как мультипликативный тип взаимодействий означает, что один аллель риска уже способен оказывать биологически значимое воздействие, в зависимости от генетического фона (Wray et al., 2010). В целом, понимание генетики шизофрении должно включать в себя функциональную значимость не только отдельных генов, но также взаимодействия между ними, их влияния на молекулярные пути, что в конечном итоге формирует то или иное поведение.

В конце 2000-х годов учёные опасались, что полногеномные исследования не выявят надёжных генов-кандидатов шизофрении (Crow, 2008) и, действительно, многие наиболее интересные результаты не были воспроизведены (Badner and Gershon, 2002; Lewis et al., 2003; Sanders et al., 2008). Недостатком ранних полногеномных исследований было отсутствие мощного инструментария для эффективного анализа данных. Современные технологии позволяют проводить полногеномные исследования нескольких десятков тысяч образцов. Кроме того, усовершенствование методов и технологий генетического анализа позволяет определить роль редких структурных изменений в геноме, *de novo* мутаций, а также редкие вариации числа копий (CNVs), ассоциированных с шизофренией (Walsh et al., 2008; O'Donovan et al., 2009). Многие гены-кандидаты шизофрении имеют биологическую значимость и потенциал в качестве мишеней для создания лекарственных средств. В настоящее время идентифицировано 108 генетических локусов, связанных с шизофренией, выявленных при анализе около 37 000 больных шизофренией по сравнению с 113 000 здоровых людей (Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014). Данное исследование выявило 83 новых и подтвердило 25 известных биомаркеров шизофрении, среди которых важное место занимают гены, вовлечённые в нейроразвитие, иммунный и стрессорный ответ (лимфоцитарные *CD19* и *CD20*), глутаматергическую нейротрансмиссию (*GRM3*, *GRIN2A*, *SRR*, *GRI1*), синаптическую пластичность (*CACNA1C*, *CACNB2*, *CACNA1I*), и активность

дофаминергических рецепторов 2го типа (*DRD2*). Более того, выявленные группы генов проявляют специфичную экспрессию в определённых тканях и типах клеток. Анализ последовательностей экзонов, включающий 2536 шизофреников и 2543 здоровых людей продемонстрировал полигенность заболевания, выявив редкие мутации (< 1 из 10,000) затрагивающие многие гены (Purcell et al., 2014). Авторы выявили несколько генетических кластеров, ассоциированных с шизофренией, состоящих из генов, кодирующих пост-синаптический протеиновый комплекс PSD-95, связанного с NMDA рецепторами; ARC белок (activity-regulated cytoskeleton-associated protein); мишени FMRP (fragile X mental retardation protein) протеина (Hall et al., 2014). Следует отметить, что часть генетических факторов, ассоциированных с шизофренией, также связаны с биполярным расстройством, депрессией, синдромом гиперактивности и дефицита внимания, и аутизмом (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014), предполагая, что сходство некоторых клинических симптомов может быть вызвано общими генетическими факторами.

Несмотря на прогресс в области генетики шизофрении, без дополнительных исследований невозможно ответить на такой вопрос: «Как вариации в выявленных генах влияют на функцию мозга, чтобы повысить риск заболевания шизофренией?» Следовательно, необходимо учитывать другие факторы, включая ген x среда, ген x ген взаимодействия, эпигенетические модификации, гетерогенность проявлений фенотипов шизофрении, что расширит наше представление об этиологии шизофрении и, следовательно, позволит выявить новые биологические мишени для создания биомаркеров и антипсихотиков (Burmeister et al., 2008).

2.1.2. Патогенные факторы окружающей среды

Общепринято, что биологические, экологические и психосоциальные стрессоры на протяжении всей жизни, накапливая свои неблагоприятные воздействия на нейроразвитие мозга на фоне генетической предрасположенности, провоцируют развитие психозов (O'Tuathaigh et al., 2015; van Os et al., 2010). Влияние психопатогенных факторов среды особенно критично на нескольких стадиях раннего нейроразвития, включая: 1) пренатальный и перинатальный периоды (например, рождение в зимний сезон; инфекции, перенесённые матерями во время беременности; осложнения во время родов) (Brown, 2011; van Os et al., 2010), 2) период младенчества и детства (например, социальные факторы, плохое обращение с ребёнком) (Kelly et al., 2010) и наконец, 3) подростково-юношеский период (например, психосоциальные стрессоры, злоупотребление наркотиками, включая каннабиноиды) (Casadio et al., 2000). Как было отмечено выше, генетические факторы и многочисленные факторы окружающей среды, связанные с

шизофренией, также ассоциированы с рядом других психиатрических расстройств и заболеваний нейроразвития, включая аутизм, синдром гиперактивности и дефицита внимания, а также эпилепсии (Owen, 2012), предполагая, что шизофрения является результатом взаимодействий специфических генетических факторов и факторов окружающей среды. Исследования, направленные на поиск таких психопатогенных факторов окружающей среды, позволяют выделять *этологически-релевантные манипуляции* (например, материнская депривация, социальная изоляция после отъема от матери, социальное подавление в подростковом возрасте при изучении нейроповеденческих показателей в процессе развития лабораторных мышей/крыс) или *манипуляции, связанные с экспозицией к психогенным факторам окружающей среды* (например, воспалительные реакции после инфекции и цитокин вызванные воздействия на развитие головного мозга с использованием полиинозиновой-полицитидиловой кислоты (PolyI:C) или липополисахарида (LPS)). Известно, что внутриутробное воздействие гриппа связано с повышенным риском развития шизофрении (Canon et al., 1996). Помимо гриппа подобный эффект был обнаружен и при воздействии других вирусных, бактериальных и паразитарных агентов, таких как *toxoplasma gonadii* (Brown, 2011, Mortensen et al., 2007). Появление симптомов шизофрении зависит от того, на каком сроке беременности происходит воздействие инфекции (Buka et al., 2008; Brown, Derkits, 2010), что является важным фактором при разработке действующей модели шизофрении на животных. Несмотря на то, что множество инфекционных агентов связаны с повышенным риском развития шизофрении, предполагается, что в основе общего патофизиологического механизма лежит активация материнской иммунной системы (Brown, 2011; Brown, Derkits, 2010).

Помимо инфекционных воздействий на ранних стадиях нейроразвития, на провоцирование шизофрении оказывают также такие факторы как 1) воздействие психологических стрессовых событий на беременных матерей (Weinstock, 2008; Beydoun, Saftlas, 2008), 2) пренатальная недостаточность питания (Brown, Susser, 2008), а также 3) осложнения во время родов (Lewis, Murray, 1987; Geddes, Lawrie, 1995; Cannon et al., 2002). Общеизвестно, что воздействие стрессовых событий во время беременности связано с появлением нескольких физиологических и поведенческих изменений у потомства, в том числе: снижение массы тела при рождении, сердечно-сосудистые и нейроэндокринные аномалии, дефицит внимания и когнитивные нарушения на фоне повышенной тревожности (Weinstock, 2001; Seckl, 2004; Beydoun, Saftlas, 2008). Пренатальное воздействие стресса, таким образом, является ярким примером «программирования нейроразвития на ранней стадии» - явление, которое отражает

действие стрессовых фактор во время чувствительных периодов развития, вызывающих стойкие изменения в физиологических и поведенческих функциях на протяжении всей жизни (Barker, 1995; Nyirenda, Seckl, 1998). Помимо того, что стресс на ранней стадии провоцирует развитие депрессивно-подобных и тревожных расстройств (Beydoun, Saftlas, 2008; Weinstock, 2008; Goel, Bale, 2009), эпидемиологическими исследованиями показано, что стресс во время беременности также повышает риск развития шизофрении и связанных с ней психотических расстройств у потомства (Van Os, Selten, 1998; Koenig, 2006; Khashan et al., 2008; Malaspina et al., 2008).

Пренатальная недостаточность питания также вовлечена в этиологию шизофрении (Brown, Susser, 2008; Susser et al., 2008). Наиболее значительные доказательства такой взаимосвязи получены на основе эпидемиологических исследований, демонстрирующих повышение частота заболеваний шизофренией и шизоидного расстройства личности в 2 раза как следствие пренатального воздействия во время "Голландской Голодной Зимы" в 1944-1945 (Stein et al., 1975, Hoek et al., 1998) и "Китайского голодомора" в конце 1950-х годов (Smil, 1999). Существует несколько питательных микроэлементов, которые могут быть критическими медиаторами ассоциации между недостаточностью питания впренатальный период и повышением риска развития шизофрении у потомства (Brown and Susser, 2008), включая уровень фолиевой кислоты, ретинола (витамин А) и других ретиноидов, витамина D и калорийность протеинов. Каждый из этих факторов играет решающую роль в развитии мозга плода, особенно на ранних стадиях нейроразвития. Так, фолиевая кислота важна для формирования и закрытия нервной трубки (Lucas, 2000), и дефицит фолиевой кислоты связывают с этиологией дефектов нервной трубки и шизофрении (Susser et al., 1998; van der Linden et al., 2006). Точно так же, витамины А и D играют ключевую роль в раннем морфогенезе ЦНС плода путем стимуляции экспрессии генов, ответственных за дифференциацию клеток, их пролиферацию и миграцию (Maden, 2001). Таким образом, снижение одного или нескольких из этих элементов питания при беременности может быть важным фактором повышения риска возникновения шизофрении у потомства. Повышение частоты возникновения шизофрении также часто ассоциируется с осложнением во время беременности\родах. Так, анализ медицинских записей пациентов выявил, что у 20% шизофреников наблюдались перинатальные осложнения (Lewis, Murray, 1987; McNeil et al., 2000; Cannon et al., 2002). Примечательно, что перинатальный стресс значительно чаще провоцирует шизофрению у мужчин, чем у женщин (O'Callaghan et al., 1992), симптомы шизофрении более выражены и раньше проявляются (Hultman et al., 1999; Rosso et al., 2000). Одним из потенциально важных механизмов повышенного риска шизофрении,

связанного с осложнением во время беременности\родах является перинатальная гипоксия, когда плод подвержен пониженному уровню кислорода в период близкому к рождению.

Также применение психоактивных субстанций повышает риск возникновения шизофрении, усиливая галлюцинаторно-параноидную симптоматику у больных шизофренией (Климова, Овчинников, 2015). Исследование с использованием позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) обнаружило, что низкие дозы психостимулянтов повышают чувствительность дофаминергической системы в стриатуме, и спустя несколько месяцев после отмены использования психоактивных веществ, наблюдается повышенное высвобождения дофамина в ответ на амфетамин (Voileau et al., 2006). С момента формирования дофаминергической гипотезы шизофрении (см. ниже), использование каннабиноидов стало рассматриваться как психогенный фактор окружающей среды, повышающий риск шизофрении (Moore et al., 2007).

2.2. Теории шизофрении

2.2.1. Дофаминовая теория

В 1976 году Соломон Снайдер (Snyder, 1976) впервые предложил дофаминергическую (ДА) гипотезу шизофрении, которая эволюционировала по мере накопления знаний. Так, первую версию ДА гипотезы можно было бы назвать «рецепторная гипотеза», поскольку она была основана на действии антипсихотиков и их влияния на ДА метаболизм.

Самые первые и наиболее убедительные доказательства были выдвинуты на основе действия фармакологических препаратов. Еще в 1963 году Арвид Карлсон (Carlsson, Lindqvist, 1963) наблюдал изменения уровня ДА метаболитов у крыс, получающих нейролептики, что позволило автору предположить, что такие изменения связаны с усилением проводимости ДА нейронов в ответ на блокаду ДА рецепторов нейролептиками. Мониторинг связывания лигандов ДА рецепторами позволил выявить, что нейролептики, обладающие терапевтическими свойствами, селективно и с высокой связывающей способностью (аффинность) блокируют ДА рецепторы 2го типа (D2). Амфетамин, который высвобождает везикулярный ДА, напротив, усугублял симптомы шизофрении (Janowsky et al., 1973).

Прямым доказательством того, что ДА системы головного мозга напрямую опосредуют шизофреноподобное поведение, явилось исследование Филип Симана (Seeman et al., 1987), где было показано повышение плотности D2 рецепторов в стриатуме больных шизофренией. Однако, хроническое использование нейролептиков повышает число D2 рецепторов, а исследования пациентов на ранней стадии заболевания (еще без

использования антипсихотиков) составляет определённую трудность. Поэтому для выяснения роли D2 рецепторов в проявлении шизофреноподобных симптомов была создана генетическая линия мышей с повышенной экспрессией D2 рецепторов селективно в стриатуме (Kellendonk et al., 2006). Действительно, данная линия мышей проявила дефицит рабочей памяти и когнитивной мобильности, ассоциированных с нарушением функциональности префронтальной коры головного мозга, без изменений двигательной активности, сенсорно-моторной фильтрации информации и тревожности. Найденные изменения были вызваны изменениями, связанными с метаболизмом глюкозы, ДА, и активностью ДА рецепторов 1го типа в префронтальной коре. Полученные результаты с использованием данной генетической линии мышей, подтверждают ключевой вклад ДА и D2 рецепторов в этиологию шизофрении. Более современные молекулярные исследования непосредственно зарегистрировали повышение синтеза ДА в пресинаптической части синапса и повышение его высвобождения в синаптическую щель у больных шизофренией (Howes et al., 2015; Abi-Dargham et al., 2000; Laruelle et al., 1996), а также у субъектов с продромальными симптомами данного заболевания (Howes et al., 2009; Mizrahi et al., 2012; Egerton et al., 2013), подтверждая гиперактивность ДА системы при шизофрении.

Однако, первая версия ДА гипотезы не объясняла взаимосвязь ДА гиперактивности с определенной симптоматикой шизофрении (н-р, позитивной\негативной) и пока не предоставляла ассоциаций с генетическими нарушениями или отклонениями нейроразвития. Более того, еще недостаточно было известно о точной локализации нарушений работы отделов головного мозга, поскольку для этого требовалось применение *in vivo* технологий визуализаций мозга (н-р, функциональная магнитно-резонансная технология). Кроме того, не рассматривалась взаимосвязь ДА гипотезы с другими известными факторами риска шизофрении.

В 1991 году Дэвис (Davis et al., 1991) опубликовал статью, где описывал так называемую «модифицированную ДА гипотезу шизофрении». Основным преимуществом «ДА гипотезы – версия 2» было понимание специфичности изменений функциональности ДА систем в отделах головного мозга, на основе метаболизма ДА, нейровизуализации, а также кортикально-субкортикальных взаимодействий головного мозга экспериментальных животных. Было установлено, что повышение ДА в спинномозговой жидкости или сыворотке крови больных шизофренией не является универсальным. Также было найдено, что клозапин (атипичный антипсихотик), не смотря на его низкую связывающую способность с D2 рецепторами, оказывал более эффективное действие на пациентов, устойчивых к действию других антипсихотиков. Наконец, учитывая

возможное влияние антипсихотиков на состояние D2 рецепторов в головном мозге, с помощью ПЭТ были обнаружены противоречивые результаты при исследовании D2/3 рецепторов у пациентов, которые не принимали антипсихотики.

В целом, дополнительные новые данные противоречили «ДА гипотезе-версия 1», рассматривающей повышение ДА нейротрансмиссии. Более того, парадокс заключался также в том, что пониженный уровень ДА метаболитов, обнаруженный у некоторых шизофреников, до сих пор коррелировал с выраженностью симптоматики и эффективностью антипсихотиков. Дэвис объяснил обнаруженные противоречия с различным распределением ДА рецепторов в головном мозге. Так, D1 рецепторы преобладают в кортикальных структурах мозга, в то время как D2 рецепторы – в подкорковых отделах мозга. Такое распределение ДА рецепторов даёт основание предположить, что нарушения ДА функций могут варьировать в зависимости от отдела головного мозга. Действительно, ПЭТ исследования выявили снижение кровотока в лобной коре головного мозга, что коррелировало с низким содержанием ДА метаболитов в спинномозговой жидкости (Davis et al., 1991). Поскольку уровень ДА метаболитов в спинномозговой жидкости отражал кортикальный ДА метаболизм, было предположено снижение уровня ДА в лобной коре головного мозга больных шизофренией (Davis et al., 1991). Следовательно, основным преимуществом новой версии ДА гипотезы была региональная специфичность изменений функциональности ДА систем мозга – гиподофаминергичность в лобной коре и, напротив, гипердофаминергичность в подкорковых структурах головного мозга. Исследования на людях были малоубедительны для предложенной региональной ДА специфичности, и прямые доказательства данной гипотезы были получены на основе результатов, полученных на экспериментальных животных. Так, разрушение ДА нейронов в лобной коре головного мозга повышало концентрацию ДА и его метаболитов в стриатуме, а также плотность D2 рецепторов (Rusock et al., 1980). В то время как введение ДА агонистов в область лобной коры головного мозга снижало уровень ДА в стриатуме (Scatton et al., 1982). Данные исследования позволили предположить, что при шизофрении наблюдается гиподофаминергичность в коре мозга, которая вызывает гипердофаминергичность в стриатуме. Кроме того, Дэвис предположил, что негативные симптомы шизофрении ассоциированы с кортикальной гиподофаминергичностью, основываясь на сходстве поведения экспериментальных животных или людей с разрушенными ДА нейронами коры головного мозга (Davis et al., 1991). В то время как позитивная симптоматика шизофрении ассоциирована с гипердофаминергичностью в стриатуме и эффективностью антипсихотиков.

Несмотря на существенный прогресс «ДА гипотезы-версия 2», существовал ряд недостатков данной гипотезы. Во-первых, большинство доказательств было получено на экспериментальных животных, во-вторых, было недостаточно доказательств низкого содержания ДА в коре и повышенного – в стриатуме. Оставалось неясным, как ДА нарушения связаны с клиническими симптомами, как гипер-ДА в стриатуме провоцирует бред\иллюзии у пациентов или как гипо-ДА в коре приводит, например, к состоянию сниженной мотивации\эмоциональной тупости. Более того, не рассматривались генетические факторы и влияние окружающей среды, лежащие в основе этиологии шизофрении. Важно отметить, что «ДА гипотеза-версия 2» предшествовала исследованиям, посвященным в дальнейшем нейроразвитию и продромальным аспектам шизофрении.

В 2009 году была предложена третья версия ДА гипотезы, включающая в себя четыре компонента (Howes and Kapur, 2009). Во-первых, предполагалось, что взаимодействие множественных факторов (гены, окружающая среда) приводит к развитию шизофрении. Во-вторых, локус нарушений функционирования ДА систем мозга сместился от D2 рецепторов к пресинаптической регуляции ДА функций. В-третьих, было предположено, что ДА нарушения связаны с предрасположенностью к психозам, а не с шизофренией. Гены и психогенные факторы окружающей среды, действительно, не могут действовать в изоляции. Они провоцируют шизофрению при своём суммарном или синергестическом взаимодействии. Исследования с использованием экспериментальных животных показали, что ряд таких факторов взаимодействуют с ДА системой. Например, социальная изоляция усиливает эффекты психостимуляторов (Howes et al., 2000), или стресса (Jones et al., 1992) на ДА систему. Подобные результаты были получены и при исследовании людей. У взрослых людей, выросших в условиях низкой материнской заботы в детстве, наблюдался повышенный выброс ДА в стриатуме в ответ на стресс (Pruessner et al., 2004). Блокатор NMDA рецепторного комплекса оказывает модулирующий эффект на выброс ДА в ответ на амфетамин (Kegeles et al., 2002), что иллюстрирует взаимодействие между ДА и NMDA нейротрансмиттерными системами. ГАМКергические вставочные нейроны также вовлечены в регуляцию подкорковых функций ДА систем и патогенез шизофрении (Wassef et al., 2003). Взаимодействия между генами, вовлечёнными в функционирование ДА системы, а также факторами окружающей среды, вызывают нарушения ДА систем головного мозга. Так, полиморфизм гена COMT (catechol-o-methyl transferase) (фермент, разрушающий ДА) взаимодействует с использованием каннабиноидов в раннем возрасте, повышая риск возникновения шизофрении (Caspi et al., 2005). Некоторые гены-кандидаты, повышают чувствительность

организма к осложнениям при родах и в результате провоцируют возникновение шизофрении (Mittal et al., 2008). Важность ген x среда взаимодействий в этиологии шизофрении также доказывает следующий анализ. Так, относительный риск развития шизофрении составляет 2.9 - для мигрантов (Cantor-Graae et al., 2005), 2.0 - для людей, перенёсших осложнения при родах (Cannon et al., 2002), 2.09 - для тех, кто употребляет каннабиноиды (Moore et al., 2007) и около 10 - для тех, кто использует амфетамин (McKetin et al., 2006).

Таким образом, 3я версия ДА гипотезы успешно интегрировала вовлечение множественных факторов, которые, взаимодействуя друг с другом, в конечном итоге приводят к нарушениям одного общего пути – повышение пресинаптического ДА в стриатуме (Howes, Kapur, 2009). Таким образом, используемые в настоящее время антипсихотики не корректируют первичные нарушения, а действуют уже на вторичное звено и, следовательно, в дальнейшем разработка антипсихотиков может быть направлена на модуляцию пресинаптического уровня ДА в стриатуме.

2.2.2. Глутаматная теория

Снижение уровня глутамата в спинномозговой жидкости у больных шизофренией впервые было выявлено в 1980 году (Kim et al., 1980), что послужило причиной для исследований других нейротрансмитерных систем головного мозга. Исходная глутаматергическая гипотеза шизофрении предполагала, что дефицит глутаматергической нейротрансмиссии является основной причиной проявления симптомов шизофрении. Данная гипотеза была основана на поведенческих эффектах, вызванных соединениями, блокирующими подтип глутаматных рецепторов, а также генетических и нейробиологических исследованиях. Предполагаемая роль глутамата в патофизиологии шизофрении обновляется по мере того, как появляются новые данные о молекулярно-клеточных компонентах глутаматной нейротрансмиссии.

Глутамат является основным возбуждающим нейротрансмиттером центральной нервной системы, активируя ионотропные и метаботропные рецепторы. Считается, что глутамат использует почти половина всех нейронов головного мозга. К ионотропным рецепторам относят рецепторы альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионовой кислоты (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors - AMPAR), каинатные рецепторы, и рецепторы N-метил-D-аспартата (N-methyl-d-aspartate receptors - NMDAR) (Traynelis et al., 2010). Ионотропные глутаматные рецепторы инициируют быструю деполяризацию, обеспечивая проникновение натрия или кальция в нейроны через каналы, образованные самим рецептором. Стимуляция AMPA и каинатных рецепторов вызывает возбуждающий постсинаптический ток, вызывая потенциалы

действия. NMDAR вовлечены в поддержание долговременного компонента постсинаптического потенциала, являясь ключевыми в процессах синаптической пластичности, обучения и памяти. Каналы рецепторов NMDA пропускают кальций; их уникальность заключается в том, что они открываются лишь при сочетании двух «ключей» - лигандов и напряжения, активируясь только при совпадении деполяризационного смещения мембранного потенциала и присоединения глутамата к рецептору. Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR1-8) связаны с G-белком и классифицируются на рецепторы I группы, которые соединены с Gq-белком и рецепторы II и III группы, которые соединены с Gi/o-белком. Метаботропные рецепторы модулируют глутаматную нейротрансмиссию посредством: 1) активации сигнальных биохимических каскадных реакций на постсинаптическом уровне (mGluR I группы) и 2) регуляции высвобождения глутамата на пресинаптическом уровне (mGluR II и III групп). Некоторые mGlu-рецепторы, в особенности, принадлежащие к подтипу mGlu5, тесно взаимодействуют с NMDA рецепторами и способны напрямую модулировать функции рецепторного канала NMDA.

NMDA рецепторы являются первичной мишенью в фармакотерапии, поскольку они непосредственно вовлечены в механизмы шизофрении и выполняют центральную роль в обучении и памяти. NMDA рецепторы представляют собой гетеромерный комплекс, состоящий из двух NR1 (GluN1) и двух NR2 (GluN2A, B, C, D) субъединиц, формируя катионный канал (Traynelis et al., 2010). Все субъединицы NMDA рецептора имеют относительно крупный лиганд-связывающий домен (ligand-binding domain – LBD), и трансмембранный домен, непосредственно формирующий катионный канал. LBD NR1 субъединицы связывают глицин, а LBD NR2 – глутамат. NR2 субъединицы регулируют свойства лиганд-связывающего домена и активность катионного канала. Примечательно, что NMDA рецепторы также могут состоять из NR3 субъединицы (GluN3A, B) вместо или в добавление к NR2 субъединицам. NR3 субъединицы NMDA рецепторов, также как и NR1, имеют место для связывания глицина. Наличие NR3 субъединиц снижает чувствительность NMDA рецепторов к блокатору магния, а также их проницаемость к кальцию. NMDA рецепторы также имеют модуляторные места связывания для цинка и спермина, а внутренняя часть катионного канала связывает неконкурентные ингибиторы кетамин, МК-801 (дизоцилпин) и PCP (фенциклидин).

Несмотря на то, что существует несколько типов глутаматных рецепторов, активируемых глутаматом, в основе глутаматной теории шизофрении находится NMDA рецепторы поскольку накопилось достаточно свидетельств о том, что нарушение функционирования именно NMDA рецепторов стоит за многими молекулярными,

клеточными и поведенческими отклонениями, ассоциированными с данным заболеванием. Так, применение низких доз антагонистов NMDA рецепторов, таких как РСР или кетамин, вызывает шизофреноподобные симптомы у здоровых людей и существенно усугубляет симптомы у больных шизофренией (Javitt et al., 1991; Krystal et al., 1994; Lahti et al., 1995), такие как бред и галлюцинации, апатия, эмоциональную тупость и когнитивные нарушения (дефицит внимания, рабочей памяти, абстрактного мышления, сенсорно-моторной фильтрации информации). Таким образом, было предположено, что недостаточная активация NMDA рецепторов играет важную роль в когнитивных нарушениях, наблюдаемых при шизофрении.

Среди выявленных генов-кандидатов риска шизофрении, выделяют кластер генов, кодирующих протеины, которые влияют на функциональность NMDA рецепторов, включая, например, ген субъединицы NR1 (Ju, Cui, 2016), нейрегулин-1, кодирующий белок, воздействующий на экспрессию NMDA рецепторов посредством активации рецепторов ErbB4 (Stefansson et al., 2002), ген GRM3, кодирующий метаботропные глутаматные рецепторы подтипа mGlu3 (Egan et al., 2004), а также гены, влияющие на внутриклеточные NMDA рецептор-связанные белки, опосредующие воздействие глутаматных рецепторов на сигнальные пути (Harrison et al., 2003; Moghaddam, 2003).

В посмертных исследованиях больных шизофренией были выявлены сниженная экспрессия NR1 субъединиц в префронтальной коре, гиппокампе, повышенная экспрессия транспортеров возбуждающей аминокислоты (EAAT, excitatory amino acid transporters) в таламусе, а также изменения PSD-95 и SAP-102 внутриклеточных белков, связанных с NMDA рецепторами, в префронтальной коре и таламусе (Clinton, Meador-Woodruff, 2004). Прижизненное исследование головного мозга с использованием трейсера NMDA рецепторов - (123I)CNS-1261 выявило пониженное связывание с NMDA рецепторами в гиппокампе шизофренников, свободных от терапии (Pilowsky et al., 2005).

Важным обновлением глутаматной теории шизофрении явился тот факт, что гипофункция NMDA рецепторов может приводить к повышенному выбросу глутамата и соответственно глутаматергической нейротрансмиссии, задействуя другие рецепторы. Так, дефицит сигнала, вызванный NMDA рецепторами на терминалях ГАМКергических нейронов, нарушает их тормозное влияние на глутаматные нейроны. Высокие фармакологические дозы блокаторов NMDA рецепторов вызывают нейротоксический эффект (Olney and Farber, 1995), возможно через оксидативный стресс (Behrens et al., 2007). Примечательно, что ГАМКергические интернейроны являются особенно чувствительными к оксидативному стрессу, вызванному блокаторами NMDA рецепторов (Behrens et al., 2007; Powell et al., 2012), объясняя тем самым как гипофункция NMDA

рецепторов может вызывать потерю тормозного контроля и в результате приводить к дисфункции глутаматной нейротрансмиссии (Volman et al., 2011).

Таким образом, нарушение какого-либо одного звена, вовлечённого в регуляцию функциональности NMDA рецепторов, может нарушать процессы центральной нервной системы, что в конечном итоге проявляется в симптомах шизофрении.

2.2.3. Теория дисбаланса возбуждательных и тормозных нейронов

К настоящему времени многочисленными исследованиями доказано, что изменения в нескольких (не только в одной) нейротрансмиттерных системах лежат в основе патофизиологии симптомов шизофрении.

Дофамин и Глутамат. Изменения дофаминовой нейротрансмиссии рассматриваются во всех гипотезах, связанных с этиологией и патофизиологией шизофрении, благодаря тому, что антагонисты D2 рецепторов улучшают психотические симптомы. Действительно, клиническая эффективность антипсихотиков позитивно коррелирует с их аффинностью к D2 рецепторам (Howes et al., 2009; Laruelle, 2014). Помимо этого, несколько исследований, используя метод нейровизуализации, продемонстрировали, что амфетамин вызывает более интенсивный выброс дофамина у больных шизофренией, чем у здоровых людей (Yang et al., 1999). Хотя дофаминовая гипотеза не объясняет полностью все особенности шизофрении, наиболее вероятно, что дисрегуляция дофамина вызывает позитивные симптомы заболевания и когнитивные нарушения (Cepeda, Levine, 1998). Следовательно, обсуждая глутаматную гипотезу шизофрении, возможно предположить, что гипофункция NMDA рецепторов нарушает дофаминовую нейротрансмиссию. Действительно, антагонисты NMDA рецепторов повышают степень возбудимости дофаминергических нейронов (Levine et al., 1996; Centonze et al., 2001). Электрофизиологические записи со срезов гиппокампа трансгенных мышей с пониженным уровнем экспрессии NMDA рецепторов также выявил повышенный тонический (постоянный) ток дофаминовых нейронов (Karle et al., 1995). Следовательно, сниженная активность NMDA рецепторов вызывает изменения электрофизиологических свойств дофаминовых нейронов, что приводит к повышенной дофаминовой нейротрансмиссии, особенно в стриатуме.

В свою очередь дофамин также играет модуляторную роль в физиологии глутаматных рецепторов (Starr, 1995). Стриатум является ключевой структурой головного мозга, где кортикальные афференты дофаминовых и глутаматных нейронов конвергируют на ГАМКергических медиальных шипиковых нейронах (Gorelova et al., 2002; Sullivan, O'Donnell, 2012). Стимуляция D1 или D2 рецепторов оказывает противоположное действие на нейротрансмиссию, вызванную NMDA рецепторами. Так, активация D2

рецепторов снижает глутаматную нейротрансмиссию, опосредуемую NMDA рецепторами, в то время как активация D1 рецепторов сопряжена с глутаматной нейротрансмиссией (Lesh et al., 2011; Levis, Sweet, 2009). Следовательно, антагонисты D1 рецепторов ингибируют функциональность NMDA рецепторов, не оказывая антипсихотического действия, а напротив, усугубляя позитивные симптомы шизофрении (Gonzalez-Burgos, Lewis, 2012). Повышенная активация D2 рецепторов в стриатуме нарушает звенья кортико-стриато-таламической системы и ухудшает глутаматную нейротрансмиссию. Соответственно, антипсихотики, действуя как антагонисты D2 рецепторов, могут купировать симптомы шизофрении не только благодаря снижению активности дофаминовой системы, но и из-за восстановления обработки информационных процессов, опосредуемых кортико-стриато-таламической системой при повышенной функциональности NMDA рецепторов (Starr, 1995).

ГАМК и глутамат. Сравнительно недавно было установлено, на основе экспериментальных и клинических исследований, что баланс между ГАМКергической и глутаматной системами является критичным компонентом в процессах сознания (Miller, Cohen, 2001). Когнитивный дефицит является основным показателем шизофрении (Gonzalez-Burgos et al., 2011), в основе которого лежит нарушение синхронизации нейрональных сетей в ряде кортикальных регионов (Howard et al., 2003). Считается, что синхронизация нейрональной активности происходит на уровне γ -частот, нарушения γ -осцилляции были выявлены у больных шизофренией (Haenschel, Linden, 2011).

Префронтальная кора обогащена взаимосвязями между кортикальными и подкорковыми областями мозга и осуществляет контроль нейрональной активности регионов мозга, вовлечённых в когнитивный контроль и координацию входящей сенсорной и моторной информации (Basar-Eroglu et al., 2007). Дефицит рабочей памяти, процесс оценивающий, как кратковременная информация хранится и извлекается при выполнении задания, является одним из ключевых когнитивных нарушений при шизофрении (Bartos et al., 2007). Гамма осцилляции (30-80 Гц) играют важную роль в процессах рабочей памяти, поскольку γ -синхронизация повышается при повышении нагрузки на рабочую память (Whittington et al., 2011). Больные шизофренией продемонстрировали недостаток рабочей памяти, сопровождающейся изменениями паттерна осциляторной активности в коре головного мозга (Sohal et al., 2009), а также отсутствие повышения γ -осцилляции при усилении нагрузки на рабочую память (Williams et al., 1992). Таким образом, данные результаты свидетельствуют о том, что нарушения γ -осцилляции вызывают когнитивный дефицит.

Были выявлены механизмы, с помощью которых ГАМК ингибирование синхронизирует постсинаптическую клеточную активность (Cobb et al., 1995; Nakazawa et al., 2012). Вкратце, γ -осциляция в пределах кортикальных нейрональных связей зависит от ГАМКергической тормозной нейротрансдачи, особенно от подкласса ГАМК интернейронов, содержащих парвальбумин (parvalbumin (PV⁺)) (Cardin et al., 2009). Данный тип ГАМКергических интернейронов иннервирует кортикальные пирамидальные нейроны и контролирует передачу их нервного импульса и синхронизацию (Belforte et al., 2010; Korotkova et al., 2010). Более того, активация PV⁺ интернейронов является критичным фактором для генерации γ -осцилляций и формирования функциональных нейрональных кластеров (Mohn et al., 1999; Jespersen et al., 2014). Такие функциональные нейрональные группы также в большой степени зависят от активации NMDA рецепторов, чтобы вызвать потенциалы действия и их распространение (Karakas and Furukawa, 2014). Селективная ингибция NMDA рецепторов на ГАМКергических интернейронах вызывала шизофреноподобное поведение у генетически-модифицированных мышей (Javitt et al., 2004; Lipina et al., 2005; Karasawa et al., 2008). Следовательно, в состоянии гипофункции NMDA рецепторов наблюдается снижение активации PV⁺ ГАМК интернейронов, что приводит к дисингибции кортикальных пирамидальных нейронов и когнитивному дефициту.

Таким образом, было предположено, что именно нарушение дисбаланса между функциональностью возбуждающих и тормозных нейронов вовлечено в патологические механизмы шизофрении.

2.2.4. Теория нейроразвития

На основе предложенных теорий шизофрении в области нейротрансмиттерных систем в центре исследователей шизофрении долгое время оставалось создание новых антипсихотиков. К сожалению, усилия в области фармакологии не привели к значительному прогрессу лечения шизофрении, поскольку до сих пор оставалось неясным, например, что является первопричиной заболевания — изменения функциональности D2 или ГАМК рецепторов, или данные рецепторные изменения могли быть следствием хронического применения антипсихотиков. Для более полного понимания причин шизофрении направление исследований в данной области сместилось в сторону генетики, которое доминировало в начале 2000х годов, также как фармакологические исследования преобладали в конце 20 века.

Для выявления причин шизофрении относительно недавно было предложено исследовать изменения нейрональных связей в процессе нейроразвития и шизофрению стали рассматривать как болезнь нейроразвития (Lewis, Lewitt, 2002). Согласно концепции

нейроразвития, этиологические и патологические факторы данного заболевания возникают гораздо раньше, чем их клиническое проявление (Rabe-Jablonska, 2005). Однако, в отличие от других заболеваний нейроразвития, начало возникновения шизофрении отмечается в юношеском возрасте (18-20 лет), что является более поздним периодом, по сравнению, например, с аутизмом (3 года). Вероятно, что в патофизиологию шизофрении вовлечены нарушения, вызванные как генетической предрасположенностью, так и патогенными факторами окружающей среды, которые сообща нарушают постнатальное созревание головного мозга в течение нескольких лет, и в результате приводят к проявлению первых симптомов шизофрении после полового созревания (Vuka, Fan, 1999). Одной из возможных причин того, что симптомы шизофрении проявляются в юношеском возрасте, является нарушение компенсаторных механизмов в таком возрасте, которые маскировали нарушения на более ранних стадиях развития (Thomson and Levitt, 2010).

Кортикальное нейроразвитие включает такие основные этапы как: пролиферацию, миграцию, формирование нейрональных путей и миелинизацию. Первые два процесса главным образом протекают в пренатальный период жизни, а последние два доминируют в постнатальный период, примерно до 20 лет. Совокупные эффекты нейронального прунинга (сокращение числа нейронов для повышения эффективности функциональности нейросети) и накопления миелина оказывают влияние на прогрессивное снижение объёма серого вещества, что было выявлено в продольных (лонгитюдных) исследованиях. В норме наблюдается повышение функциональности тормозных синапсов и снижение возбуждающих синапсов в префронтальной коре в течение подросткового периода и начала зрелого возраста (Insel, 2010). Траектория развития головного мозга у больных шизофренией включает снижение развития тормозных путей в ранний период развития, нарушая баланс между возбуждающими и тормозными нейрональными системами в префронтальной коре головного мозга. Кроме того, снижение миелинизации нарушает нейрональные взаимосвязи. Выделяют четыре основные мишени, играющие важную роль в постнатальном созревании головного мозга, нарушение которых ассоциировано с шизофренией: 1. созревание ГАМКергических интернейронов; 2. прунинг глутаматных синапсов; 3. созревание дофаминергических нейрональных путей (особенно мезокортикальных дофаминергических связей); 4. дифференциация олигодендроцитов и миелинизация.

Созревание ГАМКергических интернейронов. Функциональные свойства ГАМКергических интернейронов кардинально изменяются во время постнатального созревания головного мозга, в частности

экспрессия таких ключевых молекул, как ГАМК и дофаминовые рецепторы (Hornung et al., 1996; Hashimoto et al., 2009). Так, функциональный ответ ГАМКергических интернейронов на агонисты D2 дофаминовых рецепторов становится более выраженным в префронтальной коре после подросткового возраста (Tseng, O'Donnell, 2007). Дефицит тормозных вставочных интернейронов играет важную роль в патофизиологии шизофрении (Lisman et al., 2008; Lewis et al., 2005). Дисфункция данных интернейронов может приводить к расторможению пирамидальных нейронов в коре и гиппокампе, а также асинхронной работе пирамидальных нейронов, что, как следствие, приводит к нарушению когнитивных симптомов, характерных для шизофрении (Uhlhaas et al., 2008). Парвальбумин-кальций-связывающий белок, является маркером подкласса тормозных интернейронов. Постмортальные исследования префронтальной коры больных шизофренией обнаружили специфические изменения именно PV⁺ подкласса интернейронов - снижение их числа и экспрессии (Beasley, 1997). Следовательно, выявление механизмов нарушения дифференциации, созревания и миграции PV⁺ интернейронов внесёт вклад в понимание патологических механизмов шизофрении. На данный момент актуально исследовать, если нарушения PV⁺ интернейронов изначально возникают, или/и вызываются дефицитом нейрональных взаимодействий, в особенности с пирамидальными нейронами. Поэтому возникают два важных вопроса: 1) каким образом нарушения пирамидальных нейронов (например, их локализация), влияют на созревание PV⁺ интернейронов в постнатальный период; и 2) каковы механизмы дефицита функциональности интернейронов, связанные с клетками-предшественниками.

Созревание мезокортикальных проекций дофаминергических нейронов.

Дофамин играет важную роль в коре головного мозга, оптимизируя соотношение «сигнал-шум» локальной кортикальной нейросети в префронтальной коре (Winterer et al., 2004). Фармакологические и генетические исследования, особенно функционального полиморфизма гена, кодирующего фермент, разрушающего дофамин - катехин-О-метилтрансферазы (Val158Met), показали, что кортикальный дофамин является медиатором обработки информации и вовлечен в процессы рабочей памяти, которые нарушены при шизофрении (Egan et al., 2001). Показано, что дофаминергические проекции из вентральной тегментальной области (VTA) в кору головного мозга формируются главным образом в постнатальный период (Tseng et al., 2007b; Rosenberg, Lewis, 1995). У здоровых людей концентрация дофамина и тирозингидроксилазы (фермент, определяющий скорость синтеза дофамина из тирозина), продолжают увеличиваться в префронтальной коре до

начала зрелого возраста (Rosenberg, Lewis, 1995; Lambe et al., 2000). Напротив, в некоторых исследованиях было найдено снижение концентрации дофамина и тирозингидроксилазы в префронтальной коре больных шизофренией (Akil et al., 1999; 2000), предполагая у них дефекты постнатального созревания мезокортикального дофаминергического пути, но механизмы, лежащие в основе такого нарушения, остаются неизвестными. Изменённые электрофизиологические свойства пирамидальных нейронов, возникших в результате нарушения взаимосвязей между возбуждающими нейронами и тормозными интернейронами, оказывают влияние на функциональность вентро-теgmentальной области, откуда берут начало дофаминергические нейроны. Также возможно, что нарушение функциональных связей незрелых кортикальных дофаминергических нейронов, вызванное стрессорами в пре- и перинатальный периоды нейроразвития, нарушают правильное созревание нейронов по причине дефицита трофических факторов, поступающих из кортикальных нейронов.

Прунинг глутаматных синапсов. Глутаматные синапсы также претерпевают динамические изменения во время постнатального созревания головного мозга. Так, при оценке плотности синапсов аутопсированного головного мозга в области средней лобной извилины, Хатенлошер с соавторами обнаружили значительное снижение числа синапсов у здоровых субъектов в подростковом возрасте (Huttenlocher et al., 1979). Примечательно, что число синапсов снижалось в ассиметричной манере и охватывало глутаматные типы синапсов (Bourgeois, Rakic, 1993). Было предположено, что нарушения, связанные с элиминацией глутаматных синапсов в подростковый период, вносят вклад в патофизиологические механизмы начала проявления симптомов шизофрении и, следовательно, шизофрения стала рассматриваться как заболевание, связанное с нарушением синаптического прунинга (Keshavan et al., 1994). Каковы же основные причины дефектной синаптической элиминации? Одной из причин, возможно, является нарушение разветвления дендритов на ранней стадии развития, связанное с динамикой синаптических шипиков, зависящей от нейрональной активности. Также возможно, что нейроиммунные взаимодействия играют важную роль. Так, например, несколько ключевых молекул иммунной системы, включая, например, комплекс гистосовместимости 1го класса (MHC class I), регулирует синаптические функции и их элиминацию (Sevens et al., 2007; Huh et al., 2000).

Миелинизация. Развитие диффузно-тензорной нейровизуализации с применением техники магнитного резонанса позволило обнаружить нарушения белого вещества у больных шизофренией (Kubicki et al., 2007). Независимо, генетический анализ аутопсированного головного мозга больных шизофренией выявил изменения экспрессии

генов, связанных с функцией олигодендроцитов (Nakak et al., 2011; Tkachev et al., 2003). Поскольку миелинизация коры головного мозга происходит в постнатальный период (в частности, миелинизация фронтальной коры завершается в подростковый период, когда наблюдается начало заболевания шизофренией), то было предположено, что нарушения, связанные с миелинизацией, играют важную роль в патофизиологии шизофрении (Venes et al., 1989; Sowell et al., 1999). Остаётся до сих пор невыясненным вопрос - каким образом нарушения, возникшие на ранних этапах развития, влияют на миелинизацию нервных волокон в более поздний период? Вероятно, нарушение миелинизации связано с генетическими факторами, а также абнормальным синаптическим прунингом, что требует дополнительных исследований.

Выяснение молекулярно-клеточных механизмов шизофрении, связанных с нейроразвитием в продромальный (предшествующий) период данного заболевания, позволит в дальнейшем разработать инновационную раннюю диагностику шизофрении и использовать превентивную терапию на ранних стадиях заболевания.

2.3. DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia-1)

2.3.1. Взаимосвязь гена *DISC1* с психическими заболеваниями

Ген *DISC1*, Disrupted-In-Schizophrenia-1, был идентифицирован при исследовании шотландской семьи, где сбалансированная хромосомная транслокация (1:11)(q42.1;q14.3) приходилась на место разрыва ген *DISC1* между 9 и 10 экзонами. Долговременные исследования данной семьи за 30-летний период обнаружили, что у 70% родственников с нарушением гена *DISC1* наблюдались такие заболевания как шизофрения, биполярное или депрессивное расстройство (St Clair et al., 1990; Millar et al., 2000). У всех пациентов наблюдался дефицит амплитуды вызванного потенциала P300, показатель обработки информационных процессов, что характерно для больных шизофренией и биполярным расстройством (Blackwood et al., 2001). Примечательно, что хромосомная транслокация помимо гена *DISC1*, нарушала также ген *DISC2*. Ген *DISC2* кодирует одноцепочечную антисмысловую РНК, комплементарную к матричной РНК (мРНК) гена *DISC1* (Millar et al., 2000). Учитывая, что антисмысловые транскрипты регулируют мРНК экспрессию (Munroe and Zhu, 2006), можно предположить, что нарушение гена *DISC2* вызывает дисрегуляцию *DISC1* экспрессии, что как следствие связано с патофизиологическими механизмами шизофрении.

Генетические исследования взаимосвязи DISC1 с психиатрическими заболеваниями
С момента открытия гена *DISC1*, многочисленными генетическими исследованиями были установлены положительные ассоциации и взаимосвязи между *DISC1* локусом и психиатрическими заболеваниями в различных популяциях (Chubb et al., 2008; Bradshaw,

Porteous, 2012). Транслокация, затрагивающая *DISC1*, уникальна для шотландской семьи, в то время как полиморфизм *DISC1* характерен для общей популяции больных шизофренией. В частности, была обнаружена ассоциация между двумя вариантами *DISC1* - *Leu607Phe* и *Ser704Cys* и шизофренией в нескольких независимых исследованиях, сопровождающиеся молекулярными, анатомическими, а также когнитивными нарушениями (Callicott et al., 2005; Eastwood et al., 2010; Singh et al., 2011).

Однако, недавние исследования, с применением более современного мета-анализа и полногеномного поиска ассоциаций, не выявили достоверной взаимосвязи между *DISC1* и шизофренией (Stefansson et al., 2009; Mathieson et al., 2012, Ripke et al., 2013; Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium, 2015). Было предположено, что *DISC1* варианты, возможно, не обладают существенным эффектом для их детекции на полногеномном уровне, и шизофрения является результатом множественных генов (Tomoda et al., 2016). Тем не менее, совокупность доказательств, используя *in vitro* и *in vivo* модели (Porteous et al., 2011), решительно поддерживает *DISC1* как генетический фактор риска данного психиатрического заболевания. Роль *DISC1* в нейроразвитии и синаптической регуляции была хорошо изучена (Mao et al., 2009; Singh et al., 2011), что расширило наше понимание молекулярно-клеточных процессов шизофрении. Собраны убедительные доказательства того, что биологические пути с участием *DISC1* и его интерактома могут играть центральную роль в патологии шизофрении, аутизма и расстройств настроения (Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2013; Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium, 2015).

Генетическая структура DISC1

Ген *DISC1* располагается на хромосоме 1q42.2 и состоит из 13 экзонов, которые продуцируют транскрипт ~ 7.5 кб (Millar et al., 2000; Millar et al., 2001). Геномные исследования продемонстрировали, что *DISC1* высоко консервативен среди различных видов животных, включая макаку, мышь, крысу, рыб, кур и собаку, без гомологии с другими протеинами (Ma et al., 2002; Ozeki et al., 2003; Taylor et al., 2003; Bord et al., 2006). Были идентифицированы различные *DISC1* транскрипты в связи с альтернативным сплайсингом гена, где ~40 представлены в тканях головного мозга (Nakata et al., 2009). Наиболее часто транскрибируемые *DISC1* транскрипты приводят к 4м различным изоформам *DISC1* – длинный (L), длинный вариант (Lv), короткий (S) и очень короткий (Es) (Nakata et al., 2009). Длинная (L) форма транслируется в *DISC1* протеин полной длины из 854 аминокислот. В длинном варианте (Lv) гена *DISC1* отсутствует 66 нуклеотидов в 11м экзоне, что соответствует 832 аминокислотам *DISC1* протеина.

Короткая изоформа (S) гена *DISC1* имеет нетранслируемый участок в 9м интроне, что приводит к DISC1 протеину, состоящему из 678 аминокислот. Наконец, очень короткая изоформа DISC1 (Es) имеет альтернативный сплайсинг 1го экзона который заканчивается после 3го экзона, что в результате соответствует DISC1 размером в 369 аминокислот (Millar et al., 2001). Анализ экспрессии DISC1 протеина тканей и клеток человека, используя вестерн блоттинг, идентифицировал четыре белковых размера — 100 кДа, 98 кДа, 75 кДа и 39 кДа, вероятно соответствующие L, Lv, S, Es изоформам *DISC1* (James et al., 2004).

2.3.2. Функции DISC1 протеина и его интерактома

Одной из основных проблем в понимании биологических эффектов DISC1 протеина является отсутствие его 3х-мерной кристаллической структуры. Используя компьютерное моделирование была предложена упрощенная вторичная структура DISC1 на основе аминокислотной последовательности (Soares et al., 2011). DISC1 протеин полной длины состоит из «головного» домена - N-конец длиной 1-350 аминокислот и «хвостового» домена — C-конец с суперспирализованной областью длиной 351-854 аминокислот (Taylor et al., 2003). Множественные исследования анализа последовательностей DISC1 ортологов выявили, что C-конец имеет более консервативные участки, чем N-конец (Chubb et al., 2008). Однако, N-конец содержит две консервативные области — регион, отвечающий за ядерную локализацию и серин-фенилаланин-обогащённый мотив (Ma et al., 2002; Taylor et al., 2003). C-конец состоит из множественных суперспирализованных областей, которые облегчают межбелковые взаимодействия с DISC1 (Taylor et al., 2003). Хромосомная транслокация (t1:11) у пациентов шотландской семьи приходится на 597 аминокислоту DISC1, которая нарушает взаимодействия протеинов с данным участком DISC1 (Millar et al., 2000).

Анализ экспрессии *DISC1* в головном мозге у взрослых животных и человека выявили его экспрессию во многих участках мозга (Millar et al., 2000), включая зубчатую извилину гиппокампа (Lipska et al., 2006), кору головного мозга, парагиппокампальную извилину, мозжечок, гипоталамус, амигдалу и обонятельные луковицы (Ma et al., 2002; Miyoshi et al., 2003). Примечательно, что экспрессия *DISC1* динамически регулируется в процессе нейроразвития. Так, максимальная экспрессия *DISC1* отмечена на 13.5 эмбриональный день (E13.5) и 35 постнатальный день (P35) в головном мозге (Shurov et al., 2004). В целом, *DISC1* экспрессия в мозге человека наиболее выражена в пренатальный, неонатальный и пубертатный период по сравнению со взрослым периодом (Lipska et al., 2006).

Многочисленные исследования экспрессии эндогенного и экзогенного DISC1 протеина, используя культуры клеток и разнообразные линии клеток, установили внутриклеточную локализацию DISC1 (Chubb et al., 2008). Наиболее DISC1-обогатненными внутриклеточными местами являются: митохондрии (Ozeki et al., 2003; James et al., 2004; Brandon et al., 2005), центросомы (Kamiya et al., 2005), цитоплазма, ядро, конус роста, дендриты (Ozeki et al., 2003; James et al., 2004; Brandon et al., 2005; Ogawa et al., 2005). Действительно, на основе анализа внутриклеточной локализации DISC1, с помощью электронной микроскопии, было подтверждено, что *DISC1* экспрессируется в аксональных окончаниях, в пост-синаптической области и дендритных шипиках (Kirkpatrick et al., 2006).

Следовательно, учитывая широкое распространение DISC1 в многочисленных областях головного мозга, различных типах нейронов и внутриклеточных отделах, можно предположить, что DISC1 вовлечён в функции нейроразвития.

Отличительным свойством DISC1 протеина является его способность взаимодействовать с множеством протеинов (Thomson et al., 2013; Brandon and Sawa, 2011) в различных отделах клетки (James et al., 2004) и в различные этапы нейроразвития головного мозга. Исследования на основе дрожжевой двугибридной системы идентифицировали 127 протеинов, взаимодействующих с DISC1 и 158 межбелковых взаимодействий, составляющих «DISC1¹⁵⁸ межбелковую сеть» или «DISC1 интерактом» (Camargo et al., 2007). На основе «DISC1 интерактома» и биохимических исследований было предположено, что DISC1 действует как скаффолдинг протеин в клетке, модулируя биоактивность взаимодействующих с ним белков. Идентификация специфичных регионов DISC1 протеина, связывающих определенные белки-партнеры DISC1, позволила «картировать» функции DISC1 межбелковых комплексов. Основная часть DISC1 взаимодействующих белков играет важную роль в процессах нейроразвития, включая нейрогенез, нейрональную миграцию, рост нейронов, формирование шипиков, а также в процессах внутриклеточной сигнальной коммуникации и синаптической пластичности (Chubb et al., 2008; Brandon et al., 2009; Brandon and Sawa, 2011; Bradshaw and Porteous, 2012).

2.3.2.a. Внутриклеточные функции

Ядро: DISC1 частично локализован в ядерных тельцах клетки (известных как promyelocytic leukaemia (PML)-тельца), где находятся места активной транскрипции генома (Sawamura et al., 2008). DISC1 протеин опосредует своё действие на транскрипцию, благодаря трём функциональным цис-элементам и «лейциновой молнии» (тип белковой структуры, часто встречающейся в ДНК-связывающих факторах

транскрипции), взаимодействующими с DISC1 в районе 607-628 аминокислоты (Sawamura et al., 2008). Примечательно, что повышенная ядерная экспрессия короткой изоформы DISC1 протеина (75-85 кДа) была обнаружена в постмортальных образцах головного мозга больных шизофренией или депрессией (Sawamura et al., 2005). DISC1 формирует комплекс с несколькими транскрипционными факторами в ядре клетки, модулируя экспрессию некоторых генов, опосредуя свои эффекты на поведение. Так, DISC1 взаимодействует с активирующими транскрипционными факторами 4/5 (ATF4/ATF5/CREB2) (Sawamura et al., 2008; Soda et al., 2013) и корепрессором ядерных рецепторов (N-CoR), модулирующего CRE-опосредованную транскрипцию генов (Sawamura et al., 2008). Примечательно, что ATF4/ATF5 преимущественно транслируются в ответ на патогенные факторы окружающей среды (н-р, недостаток питания, вирусная инфекция) (Ameri and Harris, 2008), предполагая возможные эпигенетические модификации генома. Более того, N-CoR опосредует репрессивные эффекты на ядерные рецепторы и может интегрировать активность транскрипционных факторов с гистон-модифицирующими ферментами (Watson et al., 2012). DISC1 протеин одновременно может взаимодействовать как с ATF4/CREB2 (сайт связывания кодируется экзоном 9), так и с N-CoR (сайт связывания кодируется экзоном 12), и следовательно, оказывать своё влияние на генетическую транскрипцию и эпигенетические изменения генома. Недавнее исследование показало, что социальная изоляция DISC1 мутантных мышей на ранней стадии развития повышает ДНК метилиацию гена тирозин гидроксилазы (ТГ), что вызывает снижение экспрессии ТГ в мезокортикальных областях головного мозга (Niwa et al., 2013).

Митохондрия: Митохондрия является «энергетическим депо» клетки, обеспечивая энергетическими ресурсами множество нейрональных функций. Нарушение работы митохондрий, включая, например, биоэнергетический дефицит, мутации митохондриальной ДНК, морфологические изменения, были найдены у пациентов больных шизофренией, болезнью Альцгеймера, Паркинсона и хореей Гентингтона (Chaturvedi and Flint Beal, 2013). Экспрессия *DISC1* была обнаружена в мембранах митохондрий (Ramsey et al., 2011) в ассоциации с митофилином (внутримембранный митохондриальный протеин (Park et al., 2010)). Пониженная экспрессия *DISC1* вызывала снижение активности НАДН-дегидрогеназы, количество АТФ и Ca^{2+} динамики, нарушая тем самым функции митохондрий (Park et al., 2010). Недавно был идентифицирован новый митохондриальный белок - CHCM1/CHCHD6, взаимодействующий с DISC1 и митофилином (An et al., 2012). Белковый комплекс DISC1, митофилин и CHCM1/CHCHD6 вовлечён в формировании митохондриальных крист, рост клетки, синтез АТФ, и

потребление кислорода. Нарушение функций/экспрессии одного из данных протеинов может дезорганизовывать работу митохондрий, содействуя психопатологическим механизмам ментальных расстройств.

Моторные белки: Моторными белками являются «молекулярные моторы» клетки, которые перемещаются вдоль поверхности подходящих субстратов. Кинезины и цитоплазматические динеины регулируют внутриклеточный anterogradный и retrogradный транспорт с вовлечением микротрубочек. Данный процесс включает: перемещение синтезированных протеинов, везикул к синапсам или аксональным точкам роста, повторное использование синаптических везикул и обратный транспорт нейротрансмиттеров в цитоплазму нейрона. DISC1 взаимодействует с кинезином-1, в результате его ингибирования снижается аксональный транспорт кинезин-ассоциированных протеинов NDEL1, LIS1, GRB2, 14-3-3 (Shinoda et al., 2007; Taya et al., 2007). FEZ1, также взаимодействующий с DISC1 протеин (Miyoshi et al., 2003), присоединяется к кинезин-1 и тубулину, чтобы облегчить anterogradный митохондриальный транспорт (Fujita et al., 2007). Нарушение структуры DISC1 в связи с межхромосомной транслокацией дезорганизует транспорт синаптических везикул, опосредованный комплексом FEZ1 и кинезин-1 (Flores et al., 2011), корректируемый литием (блокатор GSK-3). Кроме того, было выявлено, что DISC1 улучшает взаимодействия между FEZ1 и SYT1, тем самым вовлекая синаптические везикулы в синаптическую щель (Flores et al., 2011). DISC1 также формирует комплекс с динеиновой промежуточной цепочкой и адаптором динеина - динактином (Kamiya et al., 2005), подтверждая, что DISC1 вовлечён в двунаправленный внутриклеточный транспорт.

2.3.2.б. Сигнальные пути и синаптическая пластичность

DISC1 напрямую регулирует внутриклеточные сигнальные пути и синаптическую пластичность - способность синапсов усиливать\ослаблять свои функции в ответ на нейрональную активность (Балашова и др., 2013). Производное АТФ – цАМФ, является вторичным мессенджером, который передаёт внутриклеточные сигналы на эффекторные белки в ответ на стимуляцию тех или иных рецепторов. Расщепление цАМФ с образованием АМФ осуществляется фосфодиэстеразами (PDE). DISC1 связывается с несколькими цАМФ-зависимыми формами PDE4B/D (Millar et al., 2005; Murdoch et al., 2007), регулируя ферментативную активность PDE4. В частности, DISC1 взаимодействует с UCR доменом PDE4B, снижая активность PDE4B. Таким образом, формирование DISC1 x PDE4B комплекса приводит к повышению концентрации цАМФ, что в результате вызывает диссоциацию PDE4B от DISC1 протеина, повышая в конечном итоге активность PDE4B, чтобы метаболизировать цАМФ (Millar et al., 2005).

DISC1 также взаимодействует с GSK-3 (гликоген синтаза киназа-3), фермент, который фундаментально вовлечён в регуляцию нейротрансмиттерных систем (Li et al., 2007; Beaulieu et al., 2012) и синаптической пластичности (Peineau et al., 2009). Оба фермента - PDE4 и GSK-3, участвуют в механизмах действия антидепрессантов и антипсихотиков (Zhang, 2009; Beaulieu, 2012). Примечательно, что PDE4 и GSK-3 имеют перекрывающиеся места связывания с DISC1 протеином (Mao et al., 2009; Murdoch et al., 2007), предполагая, что функции данных ферментов опосредуются межбелковым комплексом с DISC1.

Установлено, что DISC1 локализован в синаптической области как пре- (Maher and Loturco, 2012), так и пост-синаптически (Clapcote et al., 2007; Bradshaw et al., 2008; Ramsey et al., 2011), доказывая роль DISC1 и взаимодействующих с ним протеинов в регуляции межнейронных связей для достижения синаптической пластичности. Так, DISC1 модулирует морфологию и плотность дендритных шипиков через Kal-7, новый протеин, взаимодействующий с DISC1 (Hayashi-Takagi et al., 2010). DISC1 отсоединяет Kal-7 от RAC1, в результате чего активность RAC1, регулятора дендритных шипиков, снижается в NMDA-зависимой манере. DISC1 также модулирует глутаматные синапсы через его взаимодействия с TNIK (Wang et al., 2011), чья экспрессия и фосфорилирование зависят от активности глутаматных рецепторов. Подавление активности TNIK пептидом, разрывающим взаимодействие DISC1 с TNIK, снижало синаптическую экспрессию PSD-95, субъединицы AMPA рецепторов – GluR1, а также кальциевого канала – CACNG2 (Wang et al., 2011). Недавнее исследование показало, что DISC1 напрямую регулирует NMDA рецепторы (Wei et al., 2014). Так, блокирование гена DISC1 повышало проводимость NMDA рецепторов в культуре кортикальных нейронов, а ингибитор PDE4B или активатор PKA нейтрализовали данный эффект. Исследование Maher и Loturco (2012) доказало, что DISC1 действует также на пресинаптическом уровне. Повышенная экспрессия укороченной формы DISC1, вызванная хромосомной транслокацией [t(1:11)], в период эмбриогенеза (*in utero*) почти в два раза повышало миниатюрные возбуждающие синаптические токи, регистрируемые на глутаматных синапсах. Оптогенетическая стимуляция нейронов, повышающая экспрессию *DISC1* на пресинаптическом уровне, облегчала высвобождение глутамата в синапсах, в то время как, пресинаптическое подавление экспрессии *DISC1* вызывало противоположный эффект (Maher and Loturco, 2012). DISC1 также модулирует глутаматную синаптическую пластичность на уровне взаимодействия с серин-рацемазой (Ma et al., 2013), ферментом, превращающего l-серин в d-серин, являющийся активным ко-агонистом NMDA рецепторов. Диссоциация DISC1 x серин-рацемаза межбелкового комплекса понижала экспрессию фермента, что вызывало

поведенческий дефицит, имитирующего гипофункциональность NMDA рецепторов, у мутантных мышей (Ma et al., 2013).

Помимо регуляции глутаматной синаптической пластичности, DISC1 также оказывает влияние на функциональность дофаминовой системы головного мозга, что показано в данной диссертационной работе. Сравнительный анализ параметров функциональности дофаминовой системы головного мозга на пяти различных DISC1 экспериментальных моделях подтвердил важную роль DISC1 в регулировании дофаминовых функций (Dahoun et al., 2017).

2.3.2.в. Нейроразвитие

Пролиферация (деление клеток): DISC1 достигает максимальной экспрессии на 14-15 эмбриональный день развития мыши, что сопровождается активным нейрогенезом в кортикальных слоях головного мозга (Mao et al., 2009). Подавление экспрессии гена DISC1 с помощью РНК в клетках-предшественниках нейронов гиппокампа понижает степень клеточной пролиферации, в то время как повышенная экспрессия DISC1 вызывает противоположный эффект (Mao et al., 2009). Пролиферация нейронов контролируется каноническим Wnt (комбинация Wg (*wingless*) и Int (*integration*)) сигнальными путями, где β -катенины регулируют транскрипцию генов, критично вовлечённых в клеточную пролиферацию (Wu and Pan, 2010). N-конец DISC1 протеина связывается с GSK-3, подавляя ферментативную активность GSK-3 (Mao et al., 2009) и вызывает диссоциацию GSK-3 с β -катенинами. В результате повышенный уровень β -катенинов стимулирует самообновление клеток-предшественников на ранней эмбриональной стадии развития. Однако, связывающая способность DISC1 с GSK-3 снижается на более поздних этапах эмбриогенеза, тем самым повышая ферментативную активность GSK-3, что приводит к деградации β -катенина. Пониженный уровень β -катенина подавляет клеточную пролиферацию и вызывает клеточную дифференциацию, в результате чего продуцируется больше нейронов (Mao et al., 2009).

DIXDC1 протеин также взаимодействует с DISC1 и, соответственно, вовлечён в регуляцию Wnt-GSK-3- β -катенин комплекса и пролиферацию кортикальных нейронов (Singh et al., 2010). LIS1 и NDE1 (или паралог NDEL1) – другие белки-партнёры DISC1 (Brandon et al 2004; Burdick et al 2008), взаимодействуют с DISC1 (места связывания - 727-854 а.к и 802-835 а.к). Дефицит LIS1 нарушает клеточную пролиферацию в связи с нарушением ориентации делящихся клеток (Yingling et al 2008), что оказывает множественные вредоносные эффекты на функции микротрубочек, что корректирует повышенная экспрессия гена NDEL1 (Yingling et al 2008). До сих пор остаётся

неизвестным, как DISC1 модулирует пролиферацию через взаимодействия с LIS1, NDEL1, GSK-3/ β -катенин и DIXDC1, и если эти пути взаимосвязаны.

Клеточная миграция: Клеточная миграция является следующим этапом после деления клеток и включает в себя: смещение цитоплазмы к ведущему концу клетки, затем ядра клетки, и наконец, сокращение всей клетки к новому месту. Во время нейроразвития пирамидные нейроны гиппокампа продуцируются в области субвентрикулярной зоны (СВЗ), которые затем мигрируют вдоль направляющих волокон, что обеспечивают глиальные клетки, для конечной миграции в кортикальные слои головного мозга. Гранулярные клетки гиппокампа, синтезируясь в области зубчатой бороздки, мигрируют в зубчатую извилину гиппокампа. У взрослых особей, клетки-предшественники нейронов либо мигрируют из СВЗ в область обонятельных луковиц через ростомиграторный путь, либо из субгранулярной зоны гиппокампа в гранулярную зону гиппокампа. У клеток с подавленной экспрессией *DISC1* нарушается распознавание направляющих волокон во время миграции (Valiente and Martini, 2009). Так, снижение экспрессии гена *DISC1* на стадии эмбриогенеза подавляло кортикальную нейрональную миграцию, что корректировалось повышенной экспрессией *DISC1* (Kamiya et al., 2005; Kubo et al., 2010). *DISC1* совместно с NMDA рецепторами также регулирует миграцию кортикальных вставочных интернейронов (Steinecke et al., 2012; Namba et al., 2011). Нарушение нейрональной миграции было выявлено у *DISC1* мутантных мышей - двух генетических линиях *DISC1-Q31L* и *DISC1-L100P* (Lee et al., 2011), подтверждая роль *DISC1* в процессах миграции. Более того, была выявлена особая функция *DISC1* как «переключателя» между пролиферацией и миграцией в коре головного мозга в нейроразвитии (Ishizuka et al., 2011). Фосфорилирование *DISC1* в позиции S710 (*DISC1-pS710*) блокирует его взаимодействие с GSK-3, ингибируя активность *DISC1* в качестве позитивного регулятора Wnt/ β -катенин комплекса. *DISC1-pS710* накапливается в центросомах клетки, повышая аффинность к BBS4, что в результате увеличивает содержание BBS4 в центросомах (Ishizuka et al., 2011), что является ключевым механизмом нейрональной миграции при нейроразвитии (Kamiya et al., 2008). Примечательно, что выявленная мутация *DISC1-S704C* у человека, но не другие мутации (A83V, R263Q, L697F) подавляла нейрональную миграцию в коре головного мозга в процессе нейроразвития, что было взаимосвязано с ментальными заболеваниями (Singh et al., 2011).

LIS1 и NDEL1 протеины критично вовлечены также в процессы клеточной миграции (Sasaki et al., 2000). LIS1 необходим для нормальной активности Rho GTP-азы и актин полимеризации, в ответ на внутриклеточный приток кальция, вызванный

активацией NMDA рецепторов. LIS1 также вовлечён в работу динеинов и микротрубочек, например, при присоединении centrosомы к ядру клетки. Мутированная форма LIS1 приводит к лиссэнцефалии у людей вследствие нарушенной нейрональной миграции (Wynshaw-Boris, 2007). DIXDC1 действует как «переключатель» между нейрональной миграцией и пролиферацией. Так, DISC1 x DIXDC1 комплекс без NDEL1 опосредует пролиферацию клеток-предшественников нейронов, вовлекая Wnt/GSK-3/ β -катенин биохимические процессы. В то время как присоединение NDEL1 к DISC1 x DIXDC1 межбелковому комплексу переключает функции этого комплекса на процессы миграции (Singh et al., 2010). Наконец, протеин-предшественник амилоида – APP, взаимодействует с DISC1, и также участвует в нейрональной миграции (Young-Pearse et al., 2010). Дефицит APP у мышей нарушает нейрональную миграцию, которая корректировалась повышенной экспрессией *DISC1* (Young-Pearse et al 2010).

2.4. Экспериментальные исследования шизофрении на моделях животных

2.4.1. Основные критерии модели шизофрении

Экспериментальные модели психических расстройств должны соответствовать следующим критериям: 1) происхождение (этиология, т.е. модель должна иметь такие же биологические причины дисфункций, которые являются причиной заболеваний у людей, например, генетическая мутация, факторы внешней среды); 2) симптоматика (внешние признаки, т.е. модель должна соответствовать эндофенотипам заболевания у людей); 3) нейробиология (модель должна иметь схожие биологические нарушения, которые отмечаются при данном заболевании у людей); 4) прогнозирование (модель должна иметь аналогичную реакцию на лекарственный препарат, используемый для предотвращения симптомов данного заболевания у людей) (Willner, 1984).

2.4.2. Нейробиологические эндофенотипы шизофреноподобного поведения

Важным этапом в исследованиях психиатрических заболеваний стало введение термина «эндофенотип», который разделяет психиатрические симптомы на составляющие компоненты, что позволяет выявить взаимосвязь между определённым структурным или функциональным эндофенотипом и конкретным геном (Gottesman and Gould, 2003). В 1985 году впервые были приведены основные критерии для правильного определения эндофенотипов (Gershon et al., 1986): 1) эндофенотип ассоциирован с заболеванием в определенной популяции; 2) эндофенотип наследуется из поколения в поколение; 3) проявление эндофенотипа не зависит от стадии заболевания; 4) эндофенотип ассоциирован с заболеванием у членов одной семьи; 5) эндофенотип, обнаруженный у больного члена семьи, встречается с более высокой вероятностью у здоровых членов данного семейства, чем в общей популяции. Поскольку психические расстройства имеют

сложные эндофенотипы и гетерогенную этиологию, то генетические модели на животных позволяют моделировать определенные эндофенотипы. Неудовлетворительная классификация психических заболеваний и заново предложенная концепция изучения психических расстройств (Licinio and Wong, 2013) также указывают на важность изучения взаимосвязи между отдельными эндофенотипами и генами/факторами окружающей среды.

При исследовании шизофреноподобного поведения у мышей используют ряд общепринятых тестов, оценивающих: 1) позитивные симптомы шизофрении (гиперактивность); 2) негативные симптомы (социальная отчужденность, мотивационный дефицит, кататония/каталепсия) и 3) когнитивные симптомы (дефицит рабочей памяти, пре-стимульного торможения, латентного торможения, нарушение исполнительных функций головного мозга (внимание, решение проблем), когнитивная ригидность/мобильность). В целях усовершенствования фенотипирования необходимо создавать новые тесты для оценки шизофреноподобных эндофенотипов у мышей, например, на ранней стадии нейроразвития. Тем не менее, следует иметь в виду, что для успешной трансляции в область клинической психиатрии, экспериментальные тесты должны отвечать следующим критериям: 1) сходство оцениваемых процессов центральной нервной системы у животного и человека (сходство эндофенотипов); 2) сходство этиологии (т.е. мутация в одном и том же гене вызывает, например, дефицит рабочей памяти как у животного, так и у человека); 3) оцениваемый эндофенотип у животных, также нарушен у больных шизофренией; 4) нарушение эндофенотипа корректируют антипсихотики (Lipina and Roder, 2014).

Гиперактивность как в исходном состоянии, так и в ответ на новую среду, наблюдается на многих экспериментальных моделях шизофрении (Lipska and Weinberger, 2000). Часть пациентов с шизофренией проявляют психомоторное возбуждение, которое включает гиперактивность или усиление стереотипных движений. На модели шизофрении, вызванной нарушением вентрального гиппокампа у крыс в ранний постнатальный период, показана гиперактивность в новой среде (Sams-Dodd et al., 1997). Так называемые психотомиметические («психомиметики») лекарственные средства, например, кетамин, РСР и амфетамин, повышают двигательную активность у грызунов, и данный эффект может быть скорректирован антипсихотиками (Freed et al., 1984, O'Neill and Shaw, 1999). Психомиметики усугубляют психические симптомы у шизофреников (Lahti et al., 2001), что сопоставимо с повышенной чувствительностью животных, моделирующих шизофрению, к данному классу препаратов (Gainetdinov et al., 2001). Некоторые генетические модели шизофрении, включая, например, нокаутную линию

мышей по дофаминовому переносчику (Gainetdinov et al., 1999), нейрегулину (Stefansson et al., 2002), линию с дефицитом NR1 субъединицы NMDA рецепторного комплекса (Mohn et al., 1999), линию, несущую мутацию в сайте связывания глицина NMDA рецепторного комплекса (Ballard et al., 2002), или кальсинеина (Miyakawa et al., 2003) проявляют гиперактивность. Следовательно, простое измерение двигательной активности может отражать психомоторную ажитацию, наблюдаемую у шизофреников, но следует иметь в виду, что гиперактивность наблюдается также и при синдроме дефицита внимания, или маниакально-депрессивном расстройстве.

Дефицит социального поведения также отмечается при шизофрении, хотя он не является специфичным, поскольку наблюдается, например, при расстройстве аутистического спектра или депрессии. Тем не менее, у больных шизофренией отмечают дефицит социальной мотивации (Olf et al., 2013), социальной памяти (Tseng et al., 2013), а также дефицит осознанного сопереживания эмоциональному состоянию другого человека (эмпатия) (Derntl et al., 2012). Подобные аспекты социального поведения можно также оценить и у экспериментальных мышей с помощью ряда тестов. Следует отметить, что многие тесты для оценки социального поведения проводятся на новой, нейтральной арене, что повышает исследовательскую активность и тревожность, и может повлиять на интерпретацию данных. Следовательно, дополнительные наблюдения за животными в домашней клетке помогут избежать данных проблем и более информативно описать социальное поведение. Так, автоматическая система детекции социального поведения в домашней клетке выявила ярко-выраженное одиночное поведение у мышей, несущих мутацию в гене кальсинеина с ограниченной экспрессией во фронтальной коре головного мозга (Miyakawa et al., 2003). Мыши с пониженной экспрессией NR1 субъединицы продемонстрировали социальную отчужденность в ответ на «чужака» в домашней клетке, что корректировал антипсихотик - клозапин (Mohn et al., 1999). Гнездовое поведение у грызунов также информативно отражает кооперативное поведение между сородичами, и психомиметики (амфетамин, мескалин или лизергиновая кислота) нарушают гнездовое поведение у грызунов (Schneider and Chenoweth, 1970). Таким образом, тесты, оценивающие социальное поведение, могут отражать как позитивные симптомы шизофрении, так и негативные.

Когнитивные симптомы шизофрении являются ключевыми (Elvevag and Goldberg, 2000; Green 1993), поскольку наблюдаются при всех подтипах шизофрении (Heinrichs and Awad, 1993). Разработана специальная программа CNTRICS (Cognitive Neuroscience measures of Treatment Response of Impaired Cognition in Schizophrenia), согласно которой предлагается рассматривать такие домены когнитивного дефицита при шизофрении как:

1) внимание – способность удерживать внимание и/или менять фокус внимания в ответ на внешние раздражители; 2) исполнительные функции - создание правил, и их динамическое управление; 3) рабочая память – удержание цели и контроль внешних помех (Barak and Weiner, 2011).

Рабочая память требует способности быстро формировать след памяти уникальных кратковременных событий (однократное испытание или одноразовый опыт) и производить отличия достоверной в настоящее время информации от уже недействительной информации (подавление помех) (Zheng et al., 2001). Нарушения рабочей памяти могут быть вызваны недостатком гибкости поведения или усилением персеверации (переключение от ранее принятого решения к новому), что также является когнитивными симптомами шизофрении (Crider et al., 1997). У грызунов рабочая память может быть оценена в 8-лучевом радиальном лабиринте (Olton and Papas, 1979), в тестах по измерению отставленных или спонтанных изменений в Т- или Y-образных лабиринтах (Moghaddam and Adams, 1998), а также в водном лабиринте Мориса при использовании протокола по задержке согласования на месте (Steele, Morris, 1999). Продолжительность рабочей памяти у грызунов варьирует от секунд до часов в зависимости от используемого протокола.

Пре-стимульное торможение реакции вздрагивания (PPI) оценивает сенсорно-моторную фильтрацию информации и относится к ослаблению реакции вздрагивания в ответ на более слабый раздражитель (пре-стимул), который подаётся за короткое время (~100 миллисекунд) до основного стимула, моделируя процессы, предшествующие вниманию. Шизофреники часто сообщают о повышенной восприимчивости к сенсорным стимулам, что связано с перегрузкой их центральной нервной системы, вызывающей когнитивную фрагментацию (Braff et al., 2001). Дефицит PPI наблюдается у больных шизофренией (Braff et al., 2001; Swerdlow et al. 1994), и степень нарушения PPI коррелирует с выраженностью симптомов данного заболевания (Swerdlow et al., 1994). Ряд фармакологических соединений, включая дофаминергические агонисты, а также NMDAR антагонисты нарушают PPI у грызунов (Geyer et al., 2001), в то время как антипсихотики оказывают терапевтическое действие на PPI дефицит (Lipina et al., 2005, Clapcote et al., 2007). Нарушения PPI обнаружены у многих генетических линий мышей с предрасположенностью к шизофреноподобному поведению (обзор Powell et al., 2012), например, у DISC1 линий (Hikida et al., 2007; Niwa et al., 2010; Clapcote et al., 2007), нейрегулин мутантных и трансгенных мышей (Chen et al., 2008), ERBB4 нокаутной линии (Barros et al., 2009); у мышей, несущих нарушения в генах, кодирующих нейротрансмиттеры, нейропептиды и их рецепторы, например, у нокаутной линии по гену

дофаминового переносчика (Powell et al., 2008), mGluR5 рецепторам (Henry et al., 1999). Следует отметить, что PPI дефицит не является специфичным для шизофрении (Braff et al., 2001) и также наблюдается при других ментальных расстройствах, включая хорею Хантингтона (Swerdlow et al., 1994), синдром Турета (Castellanos et al., 1996), обсессивно-компульсивных расстройствах (Swerdlow and Geyer, 1993). Следовательно, для подтверждения шизофреноподобного поведения, выявленного оценкой пре-стимульного торможения, необходимо применить дополнительные, более специфичные тесты.

Латентное торможение памяти страха соответствует всем необходимым критериям теста, перечисленным выше, для его успешной трансляции в область исследования шизофрении. Латентное торможение отражает способность организма научиться игнорировать нерелевантные стимулы (Gray et al., 1992) или другими словами, субъект обучается не обращать внимания на нерелевантный стимул и в ситуации, когда данный стимул предъявляется в ситуации подкрепления, обучение тормозится. Обычно парадигма латентного торможения основана на межиндивидуальном сравнении и состоит из двух групп: первая группа с предварительной экспозицией к нейтральному, обусловленному стимулу (группа ПЭ), вторая группа – без предварительной экспозиции (БПЭ). Затем обусловленный стимул (conditioned stimulus; CS; тон) подаётся вместе с необусловленным стимулом (unconditioned stimulus; US; электрический шок) для формирования ассоциации между тоном и шоком. Латентное торможение оценивает разницу в формировании памяти страха между ПЭ и БПЭ группами и отражает торможение обучения ПЭ группой.

Дефицит внимания и обработки информации являются ключевыми особенностями шизофрении, поскольку недостаточная эффективность данных процессов может привести к когнитивной фрагментации и как следствие, нарушению сознания (Freedman et al., 1991; Perry et al., 1999; Strauss et al., 1993). Нарушение латентного торможения моделирует дефицит внимания при шизофрении. Так, латентное торможение нарушено у больных шизофренией в острой фазе, а также под влиянием амфетамина (психомиметика) как у лабораторных крыс и мышей, так и у здоровых людей (Weiner et al., 1984, 1988, 1996; Gray et al., 1992; Thornton et al., 1996; Raschle et al., 2001). Типичные и атипичные антипсихотики корректируют нарушения латентного торможения, вызванного амфетамином и усиливают латентное торможение в условиях, которые не вызывают феномен латентного торможения (Weiner, 1990, 2003; Weiner and Feldon, 1997; Moser et al., 2000). В отличие от амфетамина, антагонисты NMDA рецепторов усиливают латентное торможение, что корректируется клозапином и рisperидолом, но не галоперидолом (Weiner and Feldon, 1992; Robinson et al., 1993; Turgeon et al., 2000).

Еще одним перспективным когнитивным тестом при исследовании шизофрении является парадигма, которая оценивает смещение внимания. У людей для тестирования способности к переключению внимания используется тест сортировки карт Висконсина (WCST) (Donohoe and Robertson, 2003, Goldberg and Weinberger, 1994). В тесте WCST требуется отсортировать карты на основе трех перцепционных измерений (цвет, форма и число). Пациенты с шизофренией проявляют низкую эффективность в этом тесте (Owen et al., 1993). У грызунов также можно оценить способность к переключению внимания сходным образом (Birrell and Brown, 2000; Colacicco et al., 2002). В данном тесте испытуемые животные обучаются находить вознаграждение (еду) в паре мисок, где только в одной из них находится пища. Во время обучения субъект должен выбрать нужную миску по запаху или текстуре пола. За один сеанс, экспериментальные животные выполняют серию выборов, включая переучивание одной ассоциации с вознаграждением с другой ассоциацией, а также переключение внутри или между перцепционными измерениями. Фармакологическое ингибирование катехол-О-метилтрансферазы (ген риска возникновения шизофрении) улучшало выполнение этой задачи у крыс (Tunbridge et al., 2004). Напротив, антагонисты NMDA рецепторов нарушали процессы смещения внимания у животных (Egerton et al., 2005, Stefani and Moghaddam, 2005). Хотя данный тест относительно недавно был адаптирован для работы с мышами (Colacicco et al., 2002), многочисленные работы, с использованием фармакологических и генетических моделей шизофрении на мышах (Janitzky et al., 2016; Scheggia et al., 2014; Vinals et al., 2013), подтвердили эффективность использования этого теста при исследовании когнитивных эндотипов шизофрении.

2.4.3. Экспериментальные модели шизофрении

В настоящее время существует около 20 экспериментальных моделей шизофрении (Carpenter, Koenig, 2008), которые классифицируют в 4 категории: модели, вызванные нарушениями нейроразвития, фармакологическими соединениями, генетическими манипуляциями и разрушениями определённых структур головного мозга. Большинство экспериментальных моделей шизофрении были созданы на основе дофаминергической теории шизофрении, поэтому подавляющее число существующих моделей реплицируют позитивные симптомы, например, гиперактивность, отражающей повышенную функциональность мезолимбической дофаминовой системы, эффект метилазоксиметанола (МАО), неонатальное разрушение гиппокампа, взросление в изоляции или хроническое введение фенциклидина (PCP). Однако, терапия негативной и когнитивной симптоматики шизофрении является на данный момент наиболее актуальной проблемой в клинике. Следовательно, необходима разработка более комплексных моделей, которые более

адекватно воспроизводят дефицит данных симптомов, и помогают понять причины возникновения шизофрении.

Модели шизофрении, вызванные нарушениями нейроразвития

Эпидемиологические исследования указывают на то, что экспозиция в неонатальный период развития (во время эмбриогенеза или в перинатальный период) к неблагоприятным факторам окружающей среды, повышает риск возникновения шизофрении. Такими факторами являются стресс во время беременности, недоедание, инфекции или иммунная активация и осложнения во время родов (например, гипоксия) (Lewis, Levitt, 2002). Модели нейроразвития используют манипуляции с окружающей средой или введение препаратов в критичные периоды созревания, что приводит к необратимым последствиям созревания центральной нервной системы.

МАМ (ацетат метилазоксиметанола) обнаруженный в семенах цикадных растений, является антимитотическим агентом, который метилирует ДНК и специфично действует на пролиферацию нейробластом, без эффектов на глиальные клетки или периферические ткани (Cattabeni, DiLuca, 1997). Введение МАМ беременным крысам не влияет на размер помёта и вес детёнышей, но нарушает анатомические и функциональные свойства отдельных структур головного мозга, вызывая поведенческий дефицит (Moore et al., 2006), но эффекты МАМ зависят от гестационного дня (ГД) его введения (Fiore et al., 1999). Так, МАМ введённый на 14 день эмбриогенеза повышает исследовательскую активность у крыс, в то время как его введение на 16 и 17 дни, напротив, снижает активность, что связано с нарушением стриатальных дофаминергических нейронов (Balduini et al., 1991a). Сравнительный анализ эффектов МАМ, введённого на 15 и 17 дни эмбриогенеза, выявил, что МАМ, введённый на ГД17, но на ГД15, нарушал организацию, спорадическую плотность и гетеротопию (нарушение миграции) нейронов в СА3 области гиппокампа (Moore et al., 2006), что соответствует нарушениям, обнаруженным у больных шизофренией. Примечательно, что у крыс, которым вводили МАМ на ГД17, наблюдалось снижение нейронального фактора роста (NGF) и мозгового фактора роста нервов (BDNF) в теменной коре головного мозга (Fiore et al., 2004). В клинике у шизофреников выявлено как снижение, так и повышение уровня BDNF, поэтому данный показатель, по-видимому, не является надёжным коррелятом шизофрении (Takahashi et al., 2000; Shoval, Weizman, 2005). МАМ, введённый на ГД17, редуцирует нейрональную плотность в гиппокампе, таламусе, кортикальных областях, снижая вес головного мозга на 11% (Flagstad et al., 2004), повышает двигательную активность в ответ на амфетамин (Moore et al., 2006), увеличивает выделение дофамина в прилежащем ядре (Flagstad et al., 2004), повышает чувствительность к блокатору NMDAR (МК-801) и вызывает дефицит пристимульного

торможения (Le Pen et al., 2006). В целом, МАМ модель шизофрении соответствует позитивным и когнитивным симптомам заболевания и нейробиологическим нарушениям (структурные и дофаминергические изменения). Однако, до сих пор недостаточно была исследована эффективность антипсихотиков на МАМ модели, за исключением одной работы (Fiore et al., 2008), где показано отсутствие эффекта хронического введения клозапина и галоперидола на уровень экспрессии BDNF и NGF в гиппокампе, стриатуме и энториальной коре у экспериментальных крыс.

Социальная депривация детёнышей крыс или мышей в период после отъёма от матери нарушает развитие головного мозга и вызывает поведенческие отклонения во взрослый период (Lapiz et al., 2003; Fone and Porkess, 2008), которые не корректируются социальной ре-интеграцией в более поздний возрастной период (Pascual et al., 2006). Так, социальная изоляция грызунов провоцировала гиперактивность, неофобию, дефицит престаимпульного торможения, дефицит исполнительных функций, повышенную тревожность и агрессивность (Weiss et al., 2004; Fone, Porkess, 2008). Данный репертуар эндофенотипов получил название «изоляционный синдром», где некоторые поведенческие нарушения соответствуют симптомам шизофрении. Оценка биохимических изменений у изолянтов выявила пониженную плотность дофаминовых D1 рецепторов в префронтальной коре (Toua et al., 2010), повышенное количество высокочувствительных D2 рецепторов в стриатуме (Seeman et al., 2006), повышенный выброс дофамина в ответ на психомиметики в прилежащем ядре и стриатуме (Jones et al., 1992; Lapiz et al., 2003) - корреляты когнитивных аномалий у шизофреников (Goldman-Rakick et al., 2004). Несмотря на убедительные поведенческие, нейрохимические и структурные изменения у экспериментальных животных, выращенных в изоляции, только единичные исследования оценивали эффективность антипсихотиков. Основным недостатком данной модели шизофрении, вызванной социальной депривацией, является нестабильность поведенческих эндофенотипов, поскольку они могут варьировать из-за повторного хэндлирования животных при многократном тестировании в процессе (Weiss et al., 1999).

Известно, что материнская экспозиция к бактериальной или вирусной инфекции повышает уровень провоспалительных цитокинов, нарушая развитие головного мозга, что ассоциировано с повышенным риском развития шизофрении (Brown and Derkits, 2010).

Материнская иммунная активация (МИА) на стадии критического периода развития (ГД 9) у мышей, что соответствует второму триместру беременности у людей, вызывает шизофреноподобные эндофенотипы у мышей (Meyer et al., 2009; Meyer and Feldon, 2010), включая повышенную экспрессию тирозин гидроксилазы, гиперактивность, дефицит

престимульного торможения (Fortier et al., 2004), корректируемых антипсихотиком (Romero et al., 2007). Эффекты МИА зависят от периода воздействия (ГД), используемых агентов, стимулирующих МИА и генотипа (обзор Jones et al., 2011). Подробное описание экспериментальных моделей шизофрении с использованием МИА полно представлено в ряде обзоров (Meyer, Feldon, 2010).

Модели с разрушением определенных структур головного мозга. Билатеральное разрушение нейронов вентральной части гиппокампа у крыс на постнатальный день 7 (ПНД 7) вызывает шизофреноподобные эндофенотипы в период их полового созревания (Lipska et al., 1993), сопровождающееся нарушенной интеграцией нейронов префронтальной коры головного мозга коры и прилежащего ядра (Tseng et al., 2009). Данная модель была разработана совместно лабораториями Липска и Вейнбергер в начале 90х годов, учитывая увеличение объема желудочков головного мозга и снижение гиппокампа, выявленных у шизофреников при первом эпизоде заболевания (Lipska, Weinberger, 1994). Поведенческие нарушения, вызванные разрушением вентрального гиппокампа, постепенно появляются в период нейроразвития и полный репертуар нарушений наблюдается на ПНД 56 (Jones et al., 2011), включая гиперчувствительность к стрессу, апоморфину, МК-801 или РСР, дефицит престимульного торможения и вознаграждения (обзор Lipska, 2004). Галоперидол и рисперидон (антипсихотики) корректировали повышенную чувствительность к амфетамину у крыс с разрушенным вентральным гиппокампом (Sams-Dodd et al., 1997). Несмотря на то, что поведенческие данные указывают на повышенную функциональность лимбической дофаминовой системы, изменений уровня дофамина как в базовом состоянии, так и в ответ на амфетамин, не было обнаружено (Wan et al., 1998; Brake et al., 1999), но предположена повышенная плотность D2 рецепторов (Wan, Corbet, 1997) на основе фармакологической эффективности раклоприда корректировать гиперактивность, вызванную амфетамином. У взрослых крыс после разрушения вентрального гиппокампа на ПНД 7 наблюдалось редуцированное содержание NAA (маркер нейрональной интегративности) и GAD67 в коре головного мозга (Lipska et al., 2003) и повышенная экспрессия ГАМКергических рецепторов (Endo et al., 2007), параллельно с редуцированной плотностью синаптических протрузий и длиной дендритов (Flores et al., 2005). Разрушение вентрального гиппокампа существенно нарушало память страха, а также когнитивное поведение, оцененное в Т-лабиринте, водном лабиринте Морриса и радиальном лабиринте (Chambers et al., 1996; Le Pen et al., 2000). Экспозиция крыс с разрушенным вентральным гиппокампом к социальной изоляции, усиливала понижение дендритой длины и плотность синаптических протрузий кортикальных нейронов. Основным недостатком модели является повышенная

смертность (15%) и неспецифичность разрушения (у 30-33% экспериментальных животных наблюдалось только унилатеральное разрушение гиппокампа) (Chambers and Self, 2002). Более того, данная модель требует постоянного вживления канюли в головной мозг, что само по себе является стрессогенным воздействием.

Фармакологические модели

Амфетаминовая модель. Основываясь на гиперактивации мезолимбической ДА системы при шизофрении, впервые было предположено, что амфетамин-вызываемая стереотипия у животных отражает позитивные симптомы шизофрении (Randrup, Munkvad, 1974). Хроническое введение амфетамина у грызунов вызывает стойкую сенситизацию, повышая гиперактивность в ответ на острое введение амфетамина (Robinson and Becker, 1986), моделируя позитивные симптомы шизофрении. Однако хроническое введение амфетамина экспериментальным животным не влияло на социальное поведение, что соответствует наблюдениям на людях (Javitt, Zukin, 1991). После хронического введения амфетамина продолжительное время сохраняется дефицит престаимпульного торможения у крыс в дозо-зависимой манере (Peleg-Raibstein et al., 2006; Featherstone et al., 2007a). Сенситизация, вызванная амфетамином, также сопровождается дефицитом выполнения когнитивных задач, зависящих от функциональности префронтальной коры головного мозга (Fletcher et al., 2005; Featherstone et al., 2008), включая нарушение внимания при экстремном переключении и переучивании, что корректировалось клозапином (Martinez, Sarter, 2008). Примечательно, что повторное введение амфетамина не нарушало рабочую память и гиппокамп зависимое пространственное обучение и память (Russig et al., 2003; Featherstone et al., 2008), что свидетельствует о селективности действия амфетамина на функциональность префронтальной части головного мозга, но не гиппокампа.

Повторное введение амфетамина вызывает ряд нейрохимических и структурных изменений. Так, моторная сенситизация в ответ на амфетамин сопровождалась повышением выброса дофамина в прилежащем ядре и дорзальном стриатуме (Robinson, Becker, 1986; Featherstone et al., 2007a). Повторное введение амфетамина повышало число дендритных ответвлений и плотность дендритных шипиков в оболочке прилежащего ядра и префронтальной коры (Robinson, Kolb, 1999), но снижало экспрессию субъединиц AMPA рецепторов – GluR1 и GluR2 в префронтальной коре (Lu, Wolf, 1999). В целом, амфетаминовая модель имеет сходство с позитивными симптомами шизофрении, но не модулирует негативную или когнитивную симптоматику.

Фенциклидиновая (PCP) модель. В последнее время собрано много доказательств в пользу дисфункции глутаматной системы при шизофрении (Tsai, Coyle, 2002; Coyle et al.,

2003; Konradi and Heckers, 2003). Фармакологическое доказательство роли глутамата основано на эффектах блокаторов NMDA рецепторов (например, кетамин (МК-801) или 1-фенилциклогексил-пиперидин (фенциклидин, РСР или «ангельская пыль»)), вызывающие иллюзии, галлюцинации и скудность речи у здоровых людей (Cohen et al., 1962; Krystal et al., 1994). Более того, однократное введение РСР обостряет позитивные симптомы у пациентов с шизофренией (Javitt, Zukin, 1991), а хроническое применение РСР приводит к дефициту височной и лобной коры (Hertzmann et al., 1990).

Поскольку РСР вызывает некоторые симптомы шизофрении у здоровых людей, было предложено создать РСР модель шизофрении на экспериментальных животных. Однократное введение РСР провоцирует гиперактивность (Kalinichev et al., 2007), социальный дефицит (Sams-Dodd, 1995), дефицит престаимпульного торожения и когниции (Mansbach and Geyer, 1989; Egerton et al., 2005) у грызунов. Хотя выполнение эксперимента на людях с контролируемым приёмом РСР трудноосуществимо, повторное злоупотребление РСР провоцирует стойкие симптомы шизофрении, сохраняющиеся даже после окончания приёма этого наркотика (Rainey and Crowder, 1975). Поэтому хроническое введение РСР более адекватно для моделирования симптомов шизофрении (Jentsch and Roth, 1999). Наиболее часто в экспериментах используют субхроническое введение, следуя схеме двухкратного ежедневного введения РСР в течение 7 дней с последующим недельным перерывом перед началом эксперимента. В отличие от амфетамина, РСР вызывает не только позитивные, но также и негативные симптомы у экспериментальных животных (Jentsch and Roth., 1999). Так, субхроническое введение РСР снижает социальное поведение у крыс (Sams-Dodd, 1996) и у мышей (Qiao et al., 2001), что корректируется антипсихотиками. Хроническое введение РСР вызывает дефицит рабочей памяти (Jentsch et al., 1997b), внимания и скорости обработки информации (Amitai et al., 2007), пространственного обучения и памяти (Spano et al., 2010) и исполнительных функций (Rodefer et al., 2005). Хроническое введение РСР приводит к нейрохимическим изменениям коррелирующие с нейробиологическими показателями шизофрении. Например, мезолимбическая ДА система становится гиперчувствительной к амфетамину и стрессу, а базовый и стресс-вызванный уровень ДА понижается в префронтальной коре крыс после хронического введения РСР (Jentsch et al., 1998), что соответствует клиническим данным (Akil et al., 1999). Сходным образом РСР снижает высвобождение глутамата в коре у крыс и мышей и повышает экспрессию белка-переносчика глутамта-аспарата, соответствующее гипофункциональности глутаматной системы при шизофрении (Murai et al., 2007).

Основным недостатком модели хронического введения РСР является её несоответствие теории нейроразвития шизофрении. Поэтому на следующем этапе разработки данной фармакологической модели шизофрении было применение РСР в ранний постнатальный период развития, что вызывало стойкие поведенческие и нейрохимические нарушения у взрослых животных (Mouri et al., 2007). Однако, неонатальное введение РСР (Voctor, Ferguson, 2010) приводит к снижению веса во время развития, что нехарактерно при шизофрении. Более подробное описание РСР модели шизофрении можно найти в обзоре (Jones et al., 2011).

Генетические модели. Прогресс в области генетических методов позволяет манипулировать с экспрессией изучаемого гена как на этапах нейроразвития, так и при селективной экспрессии в той или иной нейрональной популяции, что позволяет глубже понять функциональный вклад данного гена в работу мозга. Генетически модифицированные линии мышей непрерывно генерируются и доступны исследователям из различных ресурсов: Региональный Ресурс Мутантных Мышей (IMMRRRC, <http://www.mmrrc.org/>), Европейский Архив Мутантных Мышей (EMMA, <http://www.emmanet.org/>), TaconicFarms (<http://www.taconic.com>), Биоресурсный центр RIKEN (<http://en.brc.riken.jp/index.shtml>) and Jackson Laboratories (<http://www.jax.org/>). Большинство генетических линий мышей, моделирующих определенные эндотипы шизофрении, были созданы на основе генетических исследований и прогресс в данной области детально представлен в обзорах (Arguello and Gogos, 2010; Jaaro-Peled et al., 2010; O’Tuathaigh and Waddington, 2010). Значительный вклад в понимание ДА и глутаматных механизмов шизофрении привнесли нокаутные линии мышей по генам нейрегулин1 (*neuregulin1*) (NRG1-KO), Erb4-KO (ген, кодирующий рецептор к нейрегулину1), реелин нокаутные мыши (“reeler”), мутантная линия мышей sandy (sdy) с делецией 2го экзона гена дисбайндин (*dysbindin*) и DISC1 генетические линии мышей. Для краткости, далее рассмотрим DISC1 генетические линии мышей.

DISC1 модели. Межхромосомная транслокация t(1:11), выявленная у больных шизофренией, биполярным расстройством и депрессией, вызывала разрыв *DISC1* в районе 9 экзона, что приводило к укороченной изоформе DISC1 (Millar et al 2000). Исходя из этого, было создано несколько DISC1 генетических линий мышей, экспрессирующих укороченную форму DISC1 в коре головного мозга (Hikida et al., 2007; Li et al., 2007; Pletnikov et al., 2008), во всём мозге (Shen et al., 2008), а также в пре- и пост-натальные периоды развития (Li et al., 2007; Ayhan et al., 2011). Временная пониженная экспрессия *DISC1* во время перинатального периода развития была осуществлена с помощью инъекции shDISC1 в префронтальную кору головного мозга (Niwa et al., 2010). Среди

данных DISC1 генетических линий мышей наиболее общим поведенческим эндотипом явилась гиперактивность (Hikida et al., 2007; Pletnikov et al., 2008) и повышенная чувствительность к амфетамину (Ayhan et al., 2011), доказывая, что DISC1 непосредственно регулирует дофаминергическую систему головного мозга (Niwa et al., 2010; Ayhan et al., 2011). Помимо того, у DISC1 генетических линий мышей наблюдалась гипофункциональность кортикальных областей мозга, вызывающая дефицит рабочей памяти (Li et al., 2007) и дефицит престаимпульного торможения (Hikida et al., 2007; Niwa et al., 2010). Следует отметить, что у DISC1 генетических линий мышей также отмечают эндотипы депрессивно-подобного поведения (Hikida et al., 2007; Li et al., 2007; Shen et al., 2008; Ayhan et al., 2011), что соответствует смешанным симптомам шизофрении, биполярного расстройства и депрессии, наблюдаемых у больных с хромосомной транслокацией t(1:11) (St Clair et al., 1990). Интересно, что у мышей после полного прекращения экспрессии *DISC1* (Kuroda et al., 2011) или частичном понижении его экспрессии (Koike et al., 2006; Kvaajo et al., 2008) наблюдались только умеренные нарушения в поведении, нейрогенезе, миграции нейронов или синаптогенезе, предполагая вовлечение компенсаторных механизмов, возможно, связанных с DISC1 интерактомом.

Таким образом, каждая экспериментальная модель шизофрении, как правило, только частично воспроизводит определённые эндотипы шизофрении. Большинство моделей имитируют позитивные симптомы заболевания, включая гиперактивность, что отражает гиперактивацию мезолимбической ДА системы (обзор Jones et al., 2011). Введение МАМ, РСР, разрушение гиппокампа в неонатальный период или выращивание животных в социальной изоляции частично моделируют негативные и когнитивные симптомы шизофрении, нарушая развитие и формирование кортикально-лимбических нейрональных сетей. В настоящее время актуальной задачей является создание терапевтических средств, облегчающих когнитивную симптоматику шизофрении, что является центральной проблемой заболевания. Следовательно, необходимо создание более современных моделей шизофрении, которые позволили бы более адекватно моделировать когнитивные симптомы, что позволит глубже понять этиологию и нейробиологию шизофрении.

2.5. Биомаркеры шизофрении и молекулярные мишени для создания антипсихотиков

Биомаркером является «объективно измеряемый и оцениваемый индикатор нормальных и патологических биологических процессов, который также отражает чувствительность к фармакологическим воздействиям» (Lesko and Atkinson, 2001). Биомаркеры служат для идентификации этапа заболевания, мониторируя ответ на

применяемую терапию. Реакция биомаркеров на лечение используется в клинике только, если этот показатель аккуратный, воспроизводимый, доступный для пациента, легко объяснимый и адекватно чувствительный и специфичен (Vassan, 2006). Надёжные биомаркеры, с помощью которых можно распознать раннюю стадию заболевания, являются основой для создания персонализированной медицины. Биомаркеры могут быть использованы как в целях диагностики, так и в качестве показателей в ответ на терапию (тераностика). В целом, поиск биомаркеров классифицируется на три основные группы: 1) диагностика (определение того, кто из пациентов имеет заболевание), 2) прогностика (определение того, кто из пациентов разовьёт заболевание в будущем), 3) тераностика (предсказание индивидуальной чувствительности пациентов к определенной терапии) (Weickert et al., 2013). Учитывая гетерогенность симптомов и чувствительности шизофреников к антипсихотикам, в настоящее время пока еще не выявлены надёжные биомаркеры шизофрении (Dazzan et al., 2014).

Биомаркеры подразделяются на несколько категорий, включая 1) нейровизуализацию головного мозга; 2) генетику; 3) эпигенетику; 4) протеины и 5) метаболические показатели (Rodrigues-Amorim et al., 2017).

Нейровизуализация является сравнительно новым направлением в исследовании биомаркеров шизофрении, идентифицирующей отделы головного мозга и взаимосвязи между ними (Brandt et al., 2015). Нарушение исполнительных функций, рабочей памяти, внимания и эпизодической памяти ассоциированы с объёмом префронтальной коры головного мозга у шизофреников (Gur et al., 2000; Zipparo et al., 2008). У пациентов с предрасположенностью к шизофрении отмечается снижение объёма серого вещества или плотности множественных районов в префронтальной, височной, затылочной и теменной корках головного мозга (Ehrlich et al., 2012). При исследовании взаимосвязи между структурой и функцией отделов головного мозга, используя функциональный МРТ анализ, у больных шизофренией выявлены такие надёжные биомаркеры как медиально-префронтальная кора, передняя часть поясной извилины коры головного мозга, таламус, гиппокамп, мозжечок, миндалина (Brandt et al., 2015). Более подробная информация по биомаркерам нейровизуализации представлена в обзорах (Mouchlianitis et al., 2016; Rodrigues-Amorim et al., 2017).

Поскольку этиология шизофрении гетерогенна и зависит от генетических и средовых факторов окружающей среды (Mamdani et al., 2013), то генетические исследования становятся более интегративными (Niculescu et al., 2014). Геномные технологии позволяют отследить экспрессию генов по функциональным кластерам, включая, например, нейроразвитие (Nascimento et al., 2016). Генетические биомаркеры

шизофрении включают, например, такие гены как *DRD3*, *DDX19A*, *TSMF*, *HIST1H2AC*, *IL-6*, *IFN- γ* , *SAT1*, *PTEN*, *MARK*, *FOXP3*, *CAS1*, *DISC1*, *STAT1* (Le-Niculescu et al., 2013; Cui et al., 2015). Основным ограничением генетического подхода является экстраполяция полученных данных на функциональность протеина, кодируемого исследуемым геном. Поскольку протеины подвергаются модификациям от транскрипции до посттрансляции, то уровень экспрессии гена не всегда прямолинейно отражает уровень протеина (Vogel and Marcotte, 2012). Исследования генетической экспрессии в клетках крови в ответ на введение антипсихотиков немногочисленны, и необходимы дополнительные усилия в данном направлении.

Эпигенетические механизмы относятся к сложной организации ДНК в ядре клетки и включают многие типы модификаций гистонов, ДНК, а также изменения негистоновых протеинов и некодирующие фрагменты РНК (Jaenisch and Bird, 2003; Jenuwein, 2001). ДНК метилирование возникает при добавлении метильной группы к С5 позиции цитозина (5mC), что преобладает в CpG цитозин-гуанин местах ДНК (Adachi and Monteggia, 2014). Ген-кандидат шизофрении реелин (*RELN*) имеет несколько промоторов, где повышено метилирование, что обнаружено в нейронах префронтальной коры у больных шизофренией (Abdolmaleky et al., 2005). Повышение метилирования идентифицировано для таких генов-кандидатов как *SOX10* (кодирует транскрипционный фактор, важный в нейроразвитии) (Iwamoto et al., 2005), *HLA* (human leukocyte antigen) (Pal et al., 2016); *BDNF*, *5HT1A*, *COMT* и *GAD1* (Akbarian, 2014; Allis and Jenuwein, 2016; Tsankova et al., 2007; Walton et al., 2014). Для выявления новых эпигенетических биомаркеров шизофрении необходимо учитывать, что уровень метилирования ДНК зависит от типа исследуемой ткани. Так, например, паттерн метилирования различался в различных подтипах лейкоцитов (Guidotti et al., 2014).

Протеиновые биомаркеры имеют большое разнообразие и значительный вклад в психопатологию шизофрении. Мультианалитические технологии и профилирование большого массива данных позволяют сразу выявлять сотни протеинов с высокой чувствительностью и точностью, что с успехом применяется для дальнейшей идентификации биомаркеров или кластера биомаркеров, коррелирующих с заболеванием (Ray et al., 2007). Протеомный анализ включает полный набор протеинов изучаемой биосистемы (клетка, ткань или организм) в определенном состоянии и определенном времени (Wilkins et al., 1996). Протеомные исследования биоматериала больных шизофренией обнаружили отличия белков, вовлеченных в нейротрансдукцию, синаптическую пластичность, рост нейронов (Nascimento and Martins-de-Souza, 2015). Выявлена взаимосвязь между симптомами шизофрении и уровнем экспрессии протеинов в ряде

структур головного мозга, включая лобную или префронтальную кору, переднюю часть поясной извилины коры головного мозга, мозолистое тело, височную кору головного мозга, гиппокамп и миддорзальный таламус (Davalieva et al., 2016). Наиболее часто в протеомных исследованиях анализируются постмортальные образцы префронтальной коры шизофреников. Протеомный анализ образцов в динамике заболевания является мощным инструментом для выявления новых биомаркеров. Однако, анализ биообразцов периферических тканей более вариабелен по сравнению с тканями мозга (Nascimento and Martins-de-Souza 2015). Поэтому недавно было предложено осуществлять забор тканей ольфакторного эпителия, содержащего слой нейрональных клеток, что наиболее адекватно отражает нейрональные процессы и позволяет оценить изменения на разных этапах заболевания, также как и ответ на антипсихотики (Lavoie et al., 2017). Среди протеиновых биомаркеров выделяют, например, BDNF, ИЛ-8, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, TNF- α , S100P, APOA-I (Noto et al 2011; Song et al 2014). Более подробно информация представлена в ряде обзоров (Rodrigues-Amorim et al., 2017; Giusti et al., 2016).

Метаболомом называется набор метаболитов в исследуемой биосистеме, жидкости, клетке или ткани в определенное время (Oliver et al., 1998). Метаболомный анализ биоматериала больных шизофренией выявил важный вклад глюкорегуляторных процессов и метаболизма триптофана (Holmes et al. 2006; Schwarz et al. 2008). Липидные метаболиты были идентифицированы у шизофреников на фоне приёма трёх антипсихотиков (оланзапин, рисперидон и арипипразол) (Kaddurah-Daouk et al., 2007), подтверждая ассоциацию шизофрении с повышенным уровнем триглицеридов во время ограничения приема пищи и устойчивостью к инсулину (Meyer et al., 2008; Suvisaari et al., 2007). Среди выявленных метаболомных биомаркеров шизофрении выделяют аргинин, глутамин, гистидин, орнитин (амиокислоты), C38:6 (липид) (He et al., 2012), креатин, бетаин, бензойную кислоту, алкалоид никотина и жирные кислоты (Koike et al., 2014). Более подробно информация представлена в ряде обзоров (Guest et al., 2015; Rodrigues-Amorim et al., 2017).

Основные направления для идентификации и дальнейшей верификации новых биомаркеров шизофрении включают в себя: 1) усовершенствование методов анализа для контролирования вариабильности, специфичности и эффективности; 2) понятную биологию данного биомаркера; 3) создание комплекса биомаркеров из разных функциональных групп, учитывая сложную этиологию шизофрении; 4) клиническое применение данного биомаркера (Rodrigues-Amorim et al., 2017).

Важно отметить, что прогресс в области разработки надёжных биомаркеров также зависит от создания релевантных экспериментальных моделей данного заболевания.

Нарушение функциональности головного мозга и как следствие, поведение экспериментальных животных является результирующим вектором молекулярно-биохимических изменений на уровне экспрессии генома, его эпигенетических модификаций, функциональности протеинов, межбелкового интерактома или метаболома. Следовательно, идентификация взаимосвязей между комплексом нейробиологических показателей (включая нейровизуализацию, генетические, эпигенетические, протеомные и метаболомные показатели) и психопатологическим поведением является фундаментальной задачей нейронауки. Сопоставимость биомаркеров, выявленных как на экспериментальных моделях шизофрении, так и в клинике даёт возможность глубже исследовать патологические механизмы, а также приближает к созданию новых терапевтических мишеней. Так, протеомный анализ отделов головного мозга (мозжечок, передняя часть поясной извилины коры головного мозга, зубчатая извилина и СА3 область гиппокампа), используя совместно как электрофорез на 2-х-мерном геле, так и матрично-активированную лазерную десорбцию/ионизацию (МАЛДИ) масс-спектрометрию на генетической линии мышей RELN, выявил у них значительное количество изменений, аналогичных тем, что обнаружены в клинике (Schmitt et al 2013). Так, например, у RELN гетерозиготных мышей наблюдалось снижение уровня разных форм тубулина, митохондриальной АТФ синтазы, и напротив, повышение гликолитических ферментов. Изменение экспрессии протеинов, вовлечённых в энергетический запас нейрона, или генов, ассоциированных с нейроразвитием и поддержанием цитоскелета клетки, идентифицированы также на пост-мортальных образцах мозга шизофреников (Schmitt et al 2013). Подобные исследования биомаркеров проведены на таких экспериментальных моделях шизофрении как мыши с делецией участка хромосомы 22 (22q11.1) (Arguello and Gogos, 2012), у крыс после неонатального разрушения гиппокампа (Vercauteren et al., 2007), при введении MAM соединения (Hradetzky et al., 2012), метамфетамина (Iwazaki et al., 2008), блокаторов NMDA рецепторов (Paulson et al., 2003), пре- и постнатальной материнской иммунной активации (Gyorffy et al., 2016), или использования диеты с недостатком витамина Д (McGrath et al., 2010). Сопоставление биомаркеров, идентифицированных на множественных моделях шизофрении, имеющих различную этиологию, с определёнными патологическими эндофенотипами, позволяет выявить общий паттерн генетической экспрессии, ассоциированный, например, с дефицитом исполнительной функции или рабочей памяти. Объединение доклинических результатов с аналогичной базой данных клинических исследований позволяет осуществить прямую трансляцию в клинику. Например, протеиновые биомаркеры в дорзолатеральной области префронтальной коры мозга

пациента с дефицитом рабочей памяти и внимания могут быть предложены на основе паттерна биомаркеров, выявленного на экспериментальных моделях шизофрении. Данный подход используют как для диагностических целей, так и для создания терапевтической мишени и инициации персонализированной медицины индивидуумов с определенными поведенческими эндофенотипами (Sarnyai and Guest, 2017).

Дофаминовые рецепторы 2го типа D2 были предложены в качестве мишени для создания антипсихотиков, поскольку нейролептики связываются с D2 рецепторами (van Kammen et al., 1982), блокируя D2 рецепторы и эффективно снижая некоторые позитивные симптомы шизофрении (Madras, 2013). В 1980-х годах было показано, что клозапин – антипсихотик нового поколения имеет меньшее связывание с D2 рецепторами, но более сильную аффинность к серотониновым рецепторам 2го типа – 5-HT_{2A} (Meltzer et al., 1989). На основе биохимической аффинности антипсихотические соединения (АПС) классифицируют на «типичные» или «АПС 1го поколения» (галоперидол и хлорпромазин) и «атипичные» или «АПС 2го поколения» (клозапин, рисперидон и оланзапин). Все АПС связываются с D2 рецепторами, действуя как антагонисты или инвертированные агонисты D2 рецепторов и эффективность антипсихотического действия АПС напрямую зависит от их аффинности к D2 рецепторам (Abi-Dargham and Laruelle, 2005). Хотя оба класса АПС клинически эффективны, их терапевтические свойства, а также побочные действия, существенно различаются между собой. Так, «типичные АПС» являются более эффективным средством для коррекции позитивных симптомов шизофрении (галлюцинации, иллюзии), хотя нарушают моторные функции (так называемый «экстрапирамидный синдром» (ЭПС)). Повышенное связывание «типичных» АПС с D2 рецепторами стриатальных нейронов вызывает ЭПС, поэтому наряду с терапевтической эффективностью для АПС, по-видимому, необходима их ускоренная диссоциация с D2 рецепторами (Beaulieu et al., 2005). «Атипичные» АПС уже не вызывают ЭПС и более эффективно корректируют симптомы шизофрении, но вызывают такие побочные действия, как увеличение веса, агранулоцитоз и гипотензию. Оба класса АПС не влияют на когнитивные нарушения, которые наблюдаются как при позитивной, так и при негативной симптоматике шизофрении. Поэтому в настоящее время актуально создание более эффективных АПС нового поколения на основе стратегии, связанной с поиском новых биомаркеров, либо с модуляторами D2 рецепторов внутриклеточных механизмов.

Заключение к Главе 2

В ситуации постоянного увеличения больных ментальными заболеваниями, включая шизофрению, выяснение молекулярно-клеточных механизмов данного расстройства и разработка новых и эффективных подходов ее коррекции/превенции, приобрели особую актуальность. На момент инициации данной диссертационной работы ген *DISC1* был выявлен как ген-кандидат шизофрении и DISC1 протеин представлял новую молекулярную мишень, вовлечённую в патогенез шизофрении. Однако функции N-конца «головного домена» протеина DISC1 оставались неизвестными, не смотря на уже изученные свойства C-конца «хвостового домена» белка в связи с идентификацией места разрыва между 1й и 11й хромосомами, изначально выявленного при анализе Шотландской семьи (между 9 и 10 экзонами гена *DISC1*) (St Clair et al., 1990; Millar et al., 2000). Так, было выявлено, что C-конец DISC1 взаимодействует с такими белками как LIS1, NDE1 (Brandon et al 2004), которые играют ключевую роль в процессах клеточной миграции (Sasaki et al 2000). Также ранние исследования обнаружили, что укороченная форма DISC1 после межхромосомного разрыва приводит к диссоциации между DISC1-dynein комплекса в центросоме (Kamiya et al., 2005). Следовательно, для полного понимания функций гена *DISC1* необходимо было выяснить функциональную роль «головного домена» N-конца DISC1. В связи с этим созданная точечная мутация во 2м экзоне гена *DISC1* у мышей (334T-C) приводящая к замене лейцина на пролин в кодируемом протеине DISC1 в позиции 100th аминокислоты (100P), представляла уникальную возможность. Были поставлены вопросы если 100P мутация: 1) приводит к шизофреноподобному поведению у мышей, 2) нарушает DISC1 интерактом, 3) влияет на дофаминергическую систему, 4) глиальную систему и 5) нейроразвитие? Возможно ли взаимодействие 100P мутации с патогенным фактором внешней среды – материнской иммунной активации в пренатальный период? Каковы новые молекулярно-клеточные мишени патогенных процессов на ранней стадии нейроразвития и возможно ли их скорректировать? (Рис. 1).

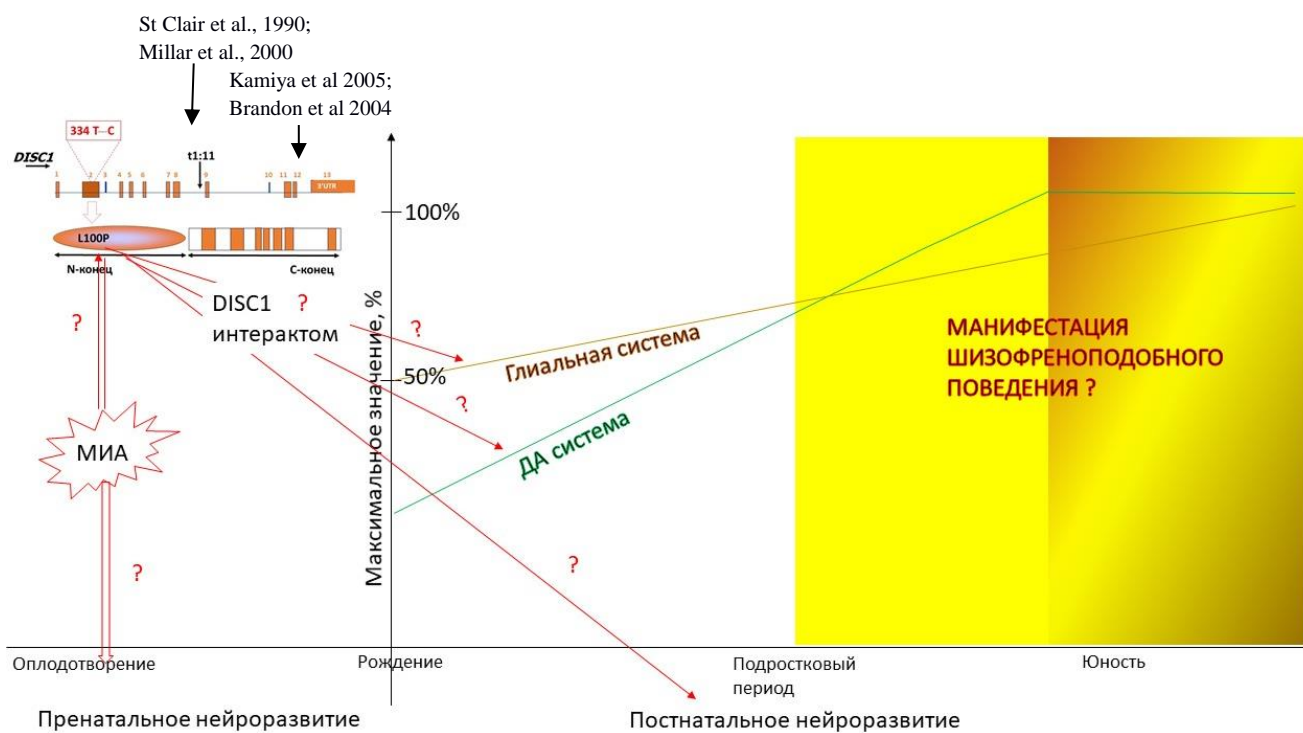


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая основные поставленные вопросы диссертационной работы. Динамика созревания дофаминовой (ДА) и глиальной систем представлена на основе обзора Jaago-Peled et al., 2010).

Глава 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Экспериментальные животные

В исследовании были использованы самцы генетических линий DISC1-Q31L (гомозиготные мыши 31L/31L), DISC1-L100P (гомозиготные мыши 100P/100P) и самцы дикого типа (инбредная линия C57BL/6NCrl; wild-type; WT; +/+). Данные генетические линии были получены при выполнении данной работы в сотрудничестве с лабораторией профессора Д. Родера (Канада) и центром RIKEN (Япония). Второй экзон гена *DISC1*, как наиболее длинный среди 13 экзонов, был скринирован в центре RIKEN (Япония) на выявление точечных мутаций у 1686 животных 1го поколения, полученных от скрещивания самцов линии C57BL/6Jcl, которым был введен химический мутаген N-ethyl-N-nitrosourea (ENU), а также самок линии DBA/2Jcl без введения ENU химического мутагена (Coghill et al., 2002). Было обнаружено 2 миссенс-мутации: 1я мутация *DISC1* Rgsc¹³⁹³ приводила к замене нуклеотида Аденин на нуклеотид Тимин в 127м триplete CAG. В результате такой замены произошла замена аминокислоты Глутамин (Q) на Лейцин (L), кодируемых данными триплетами, в позиции 31й аминокислоты DISC1 протеина (DISC1-Q31L). Вторая мутация *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ приводила к замене нуклеотида Тимина на нуклеотид Цитозин в 334м триplete CTC. В результате такой замены произошла замена аминокислоты Лейцин (L) на аминокислоту пролин (P), кодируемых данными триплетами в позиции 100 аминокислоты DISC1 протеина (DISC1-L100P). Второй экзон гена *DISC1* идентичен у C57BL/6Jcl и DBA/2Jcl родительских инбредных линий мышей, подтверждая возникновение выявленных 2х точечных мутаций в результате действия ENU мутагена. Гетерозиготные мыши 2го поколения (N2), полученные в результате скрещивания гетерозиготных самцов Q31L^{+/-} и 100P^{+/-} 1го поколения с самками дикого типа C57BL/6Jcl, подвергались обратному скрещиванию с самками дикого типа C57BL/6J в течение 4х поколений (N3-N6). Затем гетерозиготы с преобладающим генетическим фоном от C57BL/6J (98.4375% у N6 поколения) скрещивались между собой для получения гомозиготных (31L/31L; 100P/100P), гетерозиготных (31L^{+/+}; 100P^{+/+}) и гибридных (31L/100P) мышей. Гетерозиготные мыши обеих линий (31L/31L; 100P/100P) в дальнейшем также подвергались обратному скрещиванию до 10-15го поколения для элиминирования дополнительных мутаций. Генотипирование 31L мутации осуществлялось согласно ПЦР протоколу с использованием праймеров: F: 5'-GGC ACC AAC TTT CTT TTG GT-3' и R: 5'-ACA AGG GAG CTC TTG AGA AAA-3'. 100P мутацию генотипировали, используя праймеры: F, 5'-AGA CCA GGC TAC ATG AGA AGC-3' и R: 5'-AAG CTG GAA GTG AAG GTG TCT-3'.

В эксперименте использованы гетерозиготные, гомозиготные мыши двух DISC1 генетических линий (31L/31L, 100P/100P) и мыши дикого типа (C57BL/6NCrl; wild-type; WT; +/+), в возрасте 2.5 - 4 мес., полученные из разведения гетерозиготных пар. Мыши содержались в виварии в стандартных пластиковых клетках по 5 животных. В экспериментальной комнате был установлен регулярный световой режим 12:12 (свет с 9:00 часов: темнота с 21:00 часов) и поддерживалась температура около 23°C. Пищу (гранулы (*Purina Mouse Chow*)) и воду животные получали в неограниченном количестве. Все экспериментальные процедуры были одобрены этическим комитетом по работе с животными Маунт Синая Госпиталя и были проведены в соответствии с требованиями Закона 1971 работы с животными провинции Онтарио и канадского Совета по уходу за животными.

3.2. Поведенческие тесты

Поведение экспериментальных животных оценивалось в общепринятых тестах на эмоциональность («открытое поле», «приподнятый крестообразный лабиринт»), депрессивно-подобное поведение (тест «принудительного плавания», тест на ангедонию «предпочтение сахарозы, социальную мотивацию и распознавание»), шизофреноподобное поведение (тест «престимульное торможение реакции вздрагивания», «латентное торможение памяти страха», «Т-образный лабиринт») и базовые когнитивные способности (тест «водный лабиринт Морриса») с сопутствующими контрольными экспериментами для исключения потенциальных сенсорно-моторных нарушений (тест на чувствительность к сахарозе, тест на обоняние, тест на порог реакции вздрагивания) (Lipina, Roder, 2014). Эксперименты проводили с 9 утра до 17 часов вечера. Субъективные тесты (например, тест «Приподнятого крестообразного лабиринта», «социальная мотивация и распознавание», «вынужденное плавание») записывали на видео и затем видео материалы анализировали с помощью программы (Observer 5.0, Noldus Information Technology, Netherland). За 30 минут до тестирования экспериментальные мыши адаптировались к комнате, где проходило тестирование. Поведенческие установки протирали 70% раствором этанола после каждой тестируемой мыши для удаления запахов.

3.2.1. Эмоциональное поведение

Тест «Открытое поле». В эксперименте использовалось 2 типа установок «открытое поле». С 2007 по 2009 г. использовали установку из плексигласа (41 см×41см×33 см³) (модель 7420/7430; Ugo Basile, Comerio VA, Italy), где регистрировали число пересечённых горизонтальных и вертикальных сенсоров (инфракрасных лучей). С 2009 по 2014 г. использовали установку из плексигласа (41 см×41см×33 см³) (Accuscan

Instruments Inc., Columbus, OH, USA), где регистрировали пройденное расстояние, вычисляемое по числу пересечённых горизонтальных и вертикальных инфракрасных лучей (VersaMax Animal Activity Monitoring System, OH, USA). Мышь помещали в центр «открытого поля» и двигательную активность оценивали в течение 5 минут или 30 минут (в зависимости от экспериментального дизайна) в условиях освещения при 600 Люкс.

Приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ). Эксперимент был проведен согласно протоколу (Avgustinovich et al., 2000). Лабиринт состоял из двух открытых рукавов (25 x 5 см), двух закрытых (25 x 5 см), и центральной платформы (5 x 5 см), располагающейся на пересечении открытых и закрытых рукавов. Установка из тёмного плексигласа была приподнята на 50 см от уровня пола. Эксперименты проводили в затемнённой комнате при освещении центральной площадки лабиринта (210 Люкс). Мышь помещали в центр ПКЛ, направляя животное в сторону закрытого рукава, регистрируя за 5 минут: число входов\выходов в каждый тип рукава и центр (если все 4 лапы животного располагаются в данном отсеке установки); продолжительность пребывания в каждом типе отсека; общее число заходов. Данные представлены в виде процента времени нахождения в каждом отсеке ПКЛ от общего времени эксперимента.

Тест «принудительного плавания». Эксперимент выполняли, как описано ранее (Cryan et al., 2002). Мышь опускалась в прозрачный пластиковый цилиндр (25 см высота x 18 см диаметр), заполненной водой 25°C до уровня 18 см. Эксперимент продолжался 5 минут, в течение которого регистрировали продолжительность: 1) активного плавания и 2) дрейфа (неподвижное состояние, допустимо минимальное движение одной лапой для удержания тела на поверхности воды). Вода в цилиндре менялась после тестирования мышей из одной клетки.

Предпочтение сахарозы. Мышей рассаживали в индивидуальные клетки. За 24 часа до начала тестирования для снижения возможной реакции стресса на новизну, мышам предоставляли свободный выбор в течение 3 часов между двумя бутылками: одна с 5% раствором сахарозы, а другая с водой. В последующие четыре дня мыши имели постоянный доступ к двум бутылкам (одна с водой, другая с 10% раствором сахарозы). Для предотвращения возможного предпочтения месторасположения поилки, положение бутылок менялось каждые 12 часов. Потребление воды и раствора сахарозы оценивали, взвешивая бутылки. Предпочтение раствора сахарозы рассчитывали, как процентное содержание потребленного раствора сахарозы по отношению к общему количеству потребляемой жидкости.

Чувствительность к сахарозе. Порядок предоставления различных концентраций сахарозы был псевдослучайным. Поилку, содержащую раствор сахарозы, устанавливали в

верхней части клетки, и каждый день меняли концентрацию сахарозы. Высчитывали объем (мл), потребляемого раствора сахарозы с учетом разницы в весе поилки.

3.2.2. Социальное поведение

Тест «Социальная мотивация и социальное распознавание». Эксперимент был выполнен в соответствии с описанием (Clarcote et al., 2007). Установка состояла из прозрачной коробки из плексигласа (51 см длина x 25.5 см ширина x 23 см высота), разделенная на три взаимосвязанных отсека одинаковых размеров. В крайние отсеки установки размещались два полых цилиндра одинакового размера (8 см диаметр × 13 см высота). Тестирование состояло из трех сессий, между сессиями мышь возвращалась в домашнюю клетку на 1-2 минуты: 1. *Адаптация.* Мышь помещали в экспериментальную установку на 5 минут. 2. *Сессия 1 («Социальная мотивация»).* В один из полых цилиндров помещали «партнёра 1» (незнакомая мышь дикого типа, того же пола, возраста и веса, что и тестируемое животное), в другой цилиндр помещали нейтральный предмет без запаха и вкуса). Тестируемая мышь помещалась в центр установки и регистрировали продолжительность и число заходов в каждый отсек установки в течение 10 минут. 3. *Сессия 2 («Социальное распознавание»).* Затем нейтральный предмет заменяли второй незнакомой мышью («партнёр 2» - мышь дикого типа, того же пола, возраста и веса, что и тестируемое животное). Соответственно, в сессии 2 тестировали реакцию животного в ответ на уже знакомого «партнёра 1» и нового «партнёра 2» в течение 10 минут.

Тест на обоняние. Сперва мышей приучали к печенью из пшеничной муки (1 x 1 x 0,5 см), которые оставляли в домашней клетке на ночь. На следующий день гранулы для грызунов были изъяты из домашней клетки на 24 часа. Испытание проводили в стандартной клетке из поликарбоната (30 x 17 x 12 см). Кусок печенья был помещен на дно клетки в случайно выбранную область, сверху насыпалась подстилка высотой 2,5 см. Затем мышь помещали в клетку и регистрировали латентный период нахождения печенья до 15 минут.

3.2.3. Когнитивное поведение

Престимульное торможение акустической реакции вздрагивания. Процедура престимульного торможения (PPI) проводилось в четырех камерах с изоляцией из пеноматериала (Med Associates, Startle Reflex System, ENV-022s). Каждая камера была оснащена акустическим стимулятором (ANL-925), платформой с усилителем-преобразователем (PHM-255A и PHM-250B) и держателем для животного, который устанавливался сверху платформы, и был достаточно просторным, чтобы позволить животному двигаться. Держатель очищали 70% этанолом после каждого тестируемого животного. Реакцию вздрагивания регистрировали и контролировали программным

обеспечением MedAssociates «Startle Reflex». Во время теста мышь помещалась в держатель. Фоновый шум составлял 65 дБ. Звуковой стимул, вызывающий реакцию вздрагивания, состоял из единичного звукового сигнала белого шума (120дБ, 40мс). Престимул состоял из престимульного шума (69, 73 или 81 дБ, соответственно, 20 мс), который подавался за 100 мс перед стимулом вздрагивания (120 дБ, 40 мс). Процедура состояла из сессий: 1) 15 мин адаптации, когда подавался только фоновый шум; 2) 5 стимулов вздрагивания; 3) 10 блоков, каждый из которых состоял из 5 типов стимулов (стимул вздрагивания; престимул 69 дБ + стимул вздрагивания; престимул 73 дБ + стимул вздрагивания; престимул 81 дБ + стимул вздрагивания; нет стимула), подаваемых в случайном порядке; 4) 5 стимулов вздрагивания. Процент престимульного торможения реакции вздрагивания, вызванный каждым престимулом, рассчитывался по формуле:

$$[1 - (\text{амплитуда реакции вздрагивания в ответ на престимул}) / (\text{амплитуда реакции вздрагивания в ответ на стимул вздрагивания})] \times 100\%.$$

Интенсивность реакции вздрагивания в ответ на стимул вздрагивания вычисляли как среднее значение сессии 3. Также оценивали реактивность вздрагивания, когда мышь подвергалась 80-ти акустическим стимулам различной шумовой интенсивности (от 75 дБ до 120 дБ; длительностью 50 мс; интервал 20-30 сек. между стимулами).

Латентное торможение памяти страха. Процедура латентного торможения проводилась в трёх экспериментальных установках (ENV-307W; Med Associates), каждая из которых была заключена в звуконепроницаемую камеру (ENV-022M). Внутренняя часть камеры была окрашена в белый цвет, а на потолке установлен динамик и лампочка. Вентиляционные отверстия на задней стенке камер обеспечивали воздушный обмен и фоновый шум (68 дБ). Камеры обуславливания были сделаны из прозрачного пластика (Perspex), имели съемные полы, состоящие либо из металлических прутьев, используемые в дни предварительного воздействия к тону и обуславливания, либо из плоского листа алюминия, используемого в дни предварительной подготовки, день после обуславливания и день тестирования. Камеры были оснащены бутылкой с металлической поилкой, соединенной с ликометром (ENV-350CM). В дни предварительного воздействия к тону и обуславливания, дверь с гильотиной предотвращала доступ к бутылке. Ток подавался через металлические стержни пола сетки, подключенные к генератору шока (ENV-414), продолжительностью в 1с и интенсивностью 0,37 мА. Звуковой стимул (тон) состоял из белого шума интенсивностью 85 дБ. Количество контактов с металлической поилкой («слизывания» капли воды) регистрировали с помощью ликометра, когда мышь контактировала с полом камеры и металлической поилкой. Компьютер с программным обеспечением MED Associates был подключен к камерам через пакет интерфейса и

контролировал администрирование всех стимулов. Камеры очищали 70% этанолом между сессиями.

Перед началом каждого эксперимента мышей взвешивали и убирали воду из клеток на 24 часа. Затем их обучали пить воду в экспериментальной камере в течение 5 дней, по 15 минут в день (период предварительной подготовки). Вес животного поддерживался не ниже 80% от первоначальной массы тела. На данном этапе мышей ежедневно сперва адаптировали к камере без доступа к воде в течение 5 минут, а затем открывали доступ к поилке. Латентный период до первого «слизывания» и количество «слизываний» регистрировались в течение 15 минут. Процедура латентного торможения проводилась на 6-9 дни и состояла из следующих четырех этапов. День 6: предварительная экспозиция к тону (ПЭ): мыши получили 40 предъявлений белого шума с интервалом между стимулами 60 секунд. Мыши *без предварительной экспозиции к тону* (БПЭ) находились в камере в течение идентичного периода времени без предъявления тона. День 7: стадия обучения: ПЭ и БПЭ мыши получали две пары тон-шок, которые подавались через 5 минут. Шок подавался сразу же после прекращения тона. Первое парное тон-шок воздействие подавалось через 5 минут после начала сессии. После последней пары тон-шок мышь оставалась в экспериментальной камере еще на 5 минут. После предварительной экспозиции и обучения мыши получали 15-минутный доступ к воде в своей домашней клетке. На следующий день (день 8) мышей возвращали к процедуре предварительной подготовки. День 9: тестирование: каждую мышь помещали в камеру с доступом к поилке. После 75 «слизываний» подавался тон и не прекращался до тех пор, пока мышь не выполняла 101 «слизываний». Регистрировали время до первого «слизывания», время для выполнения 25 «слизываний» между 50 и 75 «слизыванием» (до начала подачи тона, «период А») и время для выполнения 25 «слизываний» между 76 и 101 «слизыванием» (после начала подачи тона, «период Б»). Коэффициент подавления питья рассчитывался по формуле: «период А»/(«период А» + «период Б»). Более низкий коэффициент указывает на более сильное подавление питья. Латентное торможение выражается в разнице подавления питья между ПЭ и БПЭ группами: ПЭ мыши демонстрируют более слабое подавление питья, чем БПЭ группа.

Т-образный лабиринт. Т-лабиринт был сделан из пластика (Perspex; толщиной 0,6 мм), окрашенного в светло-бежевый цвет. Основной рукав (65 x 14 x 30 см) был соединен с двумя боковыми рукавами (30 x 14 x 30 см). Две двери были задействованы вручную, чтобы заблокировать проходы в боковые рукава. Шестиугольные кормушки (2 см высота x 9 см диаметр), размещались в конце каждого рукава и использовались, чтобы визуально скрыть приманку. Пять кусочков приманки (Froot, Kelloggs) помещали только в одну

кормушку. Для исключения влияния запаха, исходящего от приманки, несколько кусочков приманки были помещены снаружи каждого рукава в отсеках с перфорациями (диаметр 7 мм). Не было никаких визуальных стимулов, поскольку Т-лабиринт имел непрозрачные стенки и находился в испытательной комнате, лишенной визуальных ориентиров.

Обучение принудительному повторению: после адаптационного периода мышей тестировали в Т-лабиринте в течение трех дней по десять тренировок с принудительным чередованием, в течение которых один рукав был закрыт, и мышь имела максимум 2 минуты, чтобы прибежать и съесть приманку в открытом рукаве. Съев приманку, мышь была удалена из лабиринта и после 10-секундной паузы возвращалась в Т-лабиринт с доступом только к рукаву, который она ранее не посещала.

Дискретное обучение с замедленным чередованием в парном режиме: каждая дискретная тренировка состояла из пары принудительной тренировки («пример») и тренировки со свободным выбором («тест»). Во время «примера» мышь была ограничена выбором приманки в случайно выбранном рукаве. После употребления приманки и 10 секундного интервала мышь помещалась обратно в Т-лабиринт с доступом к обоим рукавам, но только рукав, который мышь не посетила в предыдущей сессии, был с приманкой. Через 40-секундный промежуточный интервал мышь помещалась обратно в лабиринт для другой пары «пример» - «тест». Случайно выбранный рукав с принудительной тренировкой использовался с равным количеством левых и правых открытых рукавов. Мышей обучали до тех пор, пока они не достигали 70% правильных выборов в течение трех последовательных дней, с 10 парами «пример»-«тест» ежедневно.

Тестирование. На следующий день, если мышь совершала правильные выборы в 70% случаев, начиналось тестирование с 5 с, 15 с и 30 с интервалами. Мышам было дано четыре тренировки с каждым интервалом во время тестирования в течение 3 дней.

Водный лабиринт Морриса. Мышам было дано четыре тренировки в первый день, когда платформа для избегания воды была видима в бассейне (1м x 1м x 0.5 м). Затем следовало 16 тренировок (4 тренировки ежедневно) для нахождения платформы, погруженной в непрозрачную воду, подбеленной белилами, в северо-восточном сегменте бассейна (СВ) с максимальным временем нахождения 90 секунд. Спустя 18 часов проводили тестирование, во время которого удаляли платформу и регистрировали время пребывания в каждом сегменте бассейна в течение 60 секунд. На следующий день следовал этап переучивания, когда мышь получала 12 тренировок (четыре тренировки ежедневно) для нахождения платформы, перемещенную в юго-западный сегмент (ЮЗ) бассейна. Спустя 18 часов после последней тренировки также проводили тестирование.

3.3. Биохимические методы

3.3.1. Вестерн блоттинг

Мышь декапитировали, выделяли на льду необходимые отделы головного мозга и хранили при -80°C для дальнейших биохимических исследований. В день эксперимента ткань головного мозга гомогенизировали в RIPA буфере (Santa Cruz Biotechnology) содержащим физиологический раствор забуференный Tris, 1% Nonidet P-40, 0.5% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS (додецил сульфат натрия), 0.004% азид натрия, PMSF (фенилметилсульфонилфторид), ортованадат натрия, смесь ингибиторов протеаз (Roche Applied Science) и фосфотаз (Sigma), затем центрифугировали при 10 000 об/мин 10 мин при 4°C . Концентрацию протеинов определяли в супернатанте по Брэдфорду (Protein Assay, BioRad). Супернатанты хранили при -80°C до проведения вестерн блоттинга. Равное количество протеинов (20-40 мкг) кипятили в буфере Лэммли, затем для разделения денатурированных протеинов проводили электрофорез в 10-15% полиакриламидном геле и осуществляли перенос протеинов на ПВДФ (поливинилидендифторид) мембрану (Life Sciences). Блокирование неспецифичных связываний осуществлялось при помещении мембраны в разбавленный раствор бычьего сывороточного альбумина с небольшим содержанием детергента Tween 20. После блокирования на мембрану наносился раствор первичных антител для инкубации в течение 10-12 часов при 4°C . Использовали следующие антитела: anti-phospho-GSK-3 α/β Ser21/9 (1:1000, Cell Signaling Technology); anti-GSK-3 β (1:1000, Invitrogen), anti-GSK-3 α (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-D2R (1:200, Santa Cruz Biotechnology), anti-LCN2 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti- β -catenin (1:2000, BD Biosciences), anti-GAPDH (1:10000, Abcam). Детекцию осуществляли с помощью вторичных антител, связанных с пероксидазой хрена и хемилюминесцентного реагента (ThermoScientific) и анализировали с помощью денситометрического метода, используя ImageJ программу. Данные нормализовали к β -catenin или GAPDH.

3.3.2. Коиммунопреципитация

Двадцать мкл протеина A/G агарозы (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) промывались с RIPA буфером. Солюбилизированные ткани головного мозга (500-700 мкг протеина) преинкубировали с 20 мкл протеина A/G агарозы 1 час при 48°C для снижения неспецифичного связывания. Магнитные «бусы» инкубировали в присутствии первичных антител: anti-DISC1 (Invitrogen, 40-6800, Carlsbad, CA), IgG (A0545, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, 1-2 Ig) в RIPA буфере 4 часа при 48°C , затем добавляли солюбилизированные экстракты тканей головного мозга. Данную смесь инкубировали 12 часов при 48°C при слабом вращении. Магнитные «бусы» промывали 4 раза RIPA буфером по 5 минут. Образцы затем кипятили 5 минут при 100°C в 20 мкл 2xSDS буфере или инкубировали

при 37°C 45 мин для смещения IgG полосы до 100 кДа и затем подвергали к SDS-PAGE. Около 50 мкг протеина, экстрагированного из тканей головного мозга, служили в качестве положительного контроля. Затем осуществлялся перенос протеинов электрофоретически на 0.2-мкм нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифичные места связывания блокировали инкубацией блотов в 5% растворе нежирного сухого молока в течение 1 час при комнатной температуре и затем инкубировали с соответствующими первичными антителами (anti-PDE4B (произведены в лаборатории M. Housley, UK) (anti-GSK-3a (#9338) или anti-GSK-3b (#9315, Cell Signalling Technology), anti-D2R (Santa Cruz Biotechnology) при 48°C в течение 12 часов при слабом вращении. Общий уровень иммунопреципитации PDE4B, GSK-3a, GSK-3b, и D2R связанных с DISC1, а также общее количество DISC1 (#LS-B2805, LifeSpan Biosciences) определяли с помощью вторичных антител, связанных с пероксидазой хрена и хемилюминесцентного реагента (ThermoScientific). Интенсивность каждого протеина анализировали с помощью денситометрического метода, используя ImageJ программу. Данные нормализовали к уровню протеинов полученных прямой иммунопреципитацией.

3.3.3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Уровень дофамина (ДА), его метаболитов – 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК), а также серотонина (5-НТ) и норадреналина (НА) оценивали в тканях головного мозга с помощью высокожидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Анализ осуществляли на приборе, состоящего из Thermo Separation Products (TSP) P4000 насоса (TSP, Piscataway, NJ), TSP AS3000 автоматического пробо-отборника с охлаждением, ESA Coulochem II электрохимическим детектора (ESA 50II Analytical Cell and 5020 Guard Cell; ESA Biosciences, Chelmsford, MA) и Spectra Physics 4290 Integrator (Spectra Physics, Irvine, CA), соединённых с компьютером и хроматографической программой TSP WOW. Мобильная фаза, водная смесь 0.098М ледяной кислоты, 0.09М ацетата натрия (pH 3.7), 0.118мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 7% метанола и 0.8мМ октансульфоната, поставлялась со скоростью 0.8 мл/мин. Разделение 100 мл-образцов выполнялось на колонке ACE 250x4.6 мм с ACE C18, 5 мм стационарной фазой. Высота пиков регистрировалась в E2 фазе с помощью электродных потенциалов (предохранительная ячейка +450 мВ: аналитические ячейки E1+100 мВ; E2 – 400 мВ). Определение количества моноаминов происходило в экстрактах 0.1 N перхлорной кислоты, за 2 x 30-минутных пробега за образец. Сперва проводили через процедуру ВЖХ надлежащим образом разбавленный образец, а затем осуществляли второй прогон, состоящий из половины

образца и половины смеси стандартов (очищенные моноамины в концентрации 10 пг/мл). Уровень моноаминов рассчитывался как пг (пикограмм) на мг ткани.

3.3.4. Определение плотности высокочувствительных дофаминовых рецепторов 2го типа - D2^{high}

Образцы со стриатумом хранили при -70°C до момента определения. Стриатум гомогенизировали в буфере (4 мг ткани на мл буфера), используя тefлоново-стеклянные гомогенизаторы с вращающимся пестиком при 500 об/мин и 10 кратным встряхиванием гомогенизатора. Буфер включал 50 mM Tris-HCl (pH 7.4 при 20C), 1 mM EDTA, 5 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 4mM MgCl₂, 120 mM NaCl. [3H]Domperidone был изготовлен по заказу как [фенил-3H(N)] domperidone (42-68 Ci/ммоль) (PerkinElmer Life Sciences Inc., Бостон, MA) и использовался в конечной концентрации 2 нМ. Поскольку константа диссоциации (K_d) [3H]domperidone с D2 рецепторами в тканях стриатума крыс составляет 0.47 нМ (Seeman et al., 2003), конечная концентрация 2 нМ [3H]domperidone связывается с 81% D2 рецепторами, согласно уравнению: $F = C/(C+K_d)$, где F – фракция рецепторов, связанных с [3H]domperidone и C = 2 нМ. Конкурентное связывание между дофамином и [3H]domperidone с D2 рецепторами определяли следующим образом. В каждую инкубационную пробирку (12 x 75 мм, стекло) добавляли в следующем порядке: 0.5 мл буфера, содержащего дофамин в различных концентрациях, а также с- или без- конечной концентрации 10 мкМ S-сульпирида для определения неспецифического связывания с дофаминовыми D2 рецепторами, 0.25 мл [3H]-domperidone и 0.25 мл гомогената ткани. Пробирки, содержащие в сумме 1 мл объёма, инкубировали 2 часа при 20°C. Инкубаты затем отфильтровывали, используя 12 луночный планшет (Titertek, Skatron, Lier, Norway) и фильтровальную бумагу со стекловолокном, предварительно замоченные в буфере (Whatman GF/C). После фильтрации инкубатов, фильтры промывали буфером 15 секунд (7.5 мл буфера), затем снимали и помещали в сцинтилляционные полистироловые мини-флаконы (7 мл, 16 x 54 мм; Valley Container Inc., Bridgeport, CT, USA). Мини-виалы заливали 4 мл сцинтиллятора (Research Products International Co., Mount Prospect, IL, USA) и спустя 6 часов оценивали уровень трития с помощью сцинтилляционного спектрометра (Beckman LS5000TA). Пропорцию высокочувствительных D2 рецепторов (D2^{high}) в стриатуме оценивали по конкурентному связыванию дофамина с [3H]domperidone как описано ранее (Seeman et al., 2003). Дофамин ингибирует связывание [3H]domperidone в двух фазах: при низких концентрациях (от 1 до 100 наномоль дофамина), что соответствует высокочувствительному состоянию D2 рецепторов и при концентрации свыше 100 наномолей дофамина. Граница раздела между этими двумя фазами была чёткая, позволяющая оценить пропорцию D2^{high} рецепторов как процент от общего числа

специфического связывания [3H]domperidone, определяемое в присутствии 10 мкМ S-сульпирида. Конкурентное связывание анализировали как описано ранее (Seeman et al., 1985).

3.3.5. Определение цитокинов иммуноферментным анализом ELISA

Самкам экспериментальных животных на 9й день беременности внутривенно вводили PBS или polyI:C (2.5 мг\кг). Спустя 6 часов животных умерщвляли с помощью смещения позвонков, выделяли матку, промывали, и помещали в чашку Петри с холодным раствором PBS. У каждого эмбриона выделяли головной мозг, помещали в жидкий азот и хранили при -80°C до дальнейшего анализа.

Образцы эмбрионального головного мозга помещали в радиоиммуно-преципитационный лизисный буфер (Santa Cruz Biotechnology), содержащий физиологический раствор с Tris буфером, 1% Nonidet P-40, 0.5% дезоксихолат натрия, 0.1% SDS, 0.004% азид натрия, PMSF, натрий ортованадат, смесь ингибиторов протеаз (Sigma), для дальнейшего центрифугирования (120000 об/мин, 4°C, 20 минут). Уровень интерлейкина-6 (ИЛ-6) оценивали с помощью иммуноферментного метода (ELISA; R&D Systems) согласно инструкции производителя и при использовании прибора FLUOstar Optima reader (BMG Labtech). Полученные данные нормализовали к уровню протеинов в экспериментальном образце, определенных с помощью Брэдфорда (Protein Assay; Bio-Rad).

3.3.6. Анализ экспрессии генов с помощью микрочипов

Выделение РНК. Экспериментальных животных, получавших вальпроат или физиологический раствор, декапитировали спустя 20 часов после поледнего введения препаратов и выделяли следующие отделы головного мозга: ствол мозга, фронтальная кора, гиппокамп, стриатум из которых выделяли РНК как описано ранее (Semaralul et al., 2006). Образцы механически гомогенизировали и лизировали в растворе Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). РНК осаждали в 70% этаноле, очищали и обрабатывали реактивами, включая ДНКазу, используя набор Absolutely RNA Miniprep kit (Stratagene, LaJolla, CA).

Подготовка мишеней и гибридизация микрочипов. Гибридизацию микрочипов и их сканирование производили в Genome Quebec Innovation Centre (Montreal, QC). Количественную оценку РНК в экспериментальных образцах производили, используя спектрофотометер (NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), и оценивали с помощью прибора Agilent Bioanalyzer 2100; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Комплементарную РНК амплифицировали и биотинилировали, используя набор реактивов для 3-6 повторов Illumina TotalPrep Amplification, для образцов каждой экспериментальной группы и гибридизировали на

микрочипе MouseRef-8 v2.0 Expression BeadChips (> 25 000 зондов, Illumina, San Diego, CA). С помощью программы BeadScan (версия 3, 2006) определяли позицию каждого зонда и интенсивность сигнала.

Анализ гибридизации микрочипов. Каждый отдел головного мозга анализировали отдельно, используя двухфакторный анализ, где основными факторами являлись препарат (вальпроат, физ. раствор) и генотип (дикий тип, 100P/100P). Полученные данные интенсивности сигналов обрабатывали, используя программное обеспечение (beadarray, v1.10.0 BioConductor (Dunning et al., 2007). Используя BASH анализ, удаляли пространственные ошибки (Cairns et al., 2008). Затем данные дополнительно обрабатывали, используя коррекцию фона Эдвардса (Edwards, 2003) и нормализовали, используя стабилизацию переменных (vsnp package of BioConductor v3.8.0; Lin et al., 2007). После этого применяли двухуровневую и двухфакторную линейную модель для каждого зонда, используя программу (limma package v2.16.3; BioConductor), следуя эмпирической регуляции стандартной ошибки и FDR (false discover rate) корректировки для множественных сравнений. Критерий отбора генов составлял 10% FDR порогового значения. Данные до и после нормализации и дополнительной обработки доступны в базе данных GEO (GSE17735). Полученные данные визуализировались, используя неконтролируемое машинное обучение (Boutros and Okey, 2005). Средние значения нормализованных сигналов интенсивностей для каждого экспериментального состояния (отдел мозга, генотип, препарат) объединяли в единую матрицу, где гены представлены в рядах, а экспериментальные группы – в колонках. Ряды выбирались на основе последовательной дисперсии (0.1, 0.25, 0.5, 1.0) или пороговых значений интенсивности сигнала (7, 8, 9, 10, 11, 12). Данная матрица была среднеквадратичного размера, которая затем подвергалась иерархической кластеризации, где в качестве метрики расстояния использовали корреляции по Пирсону. Тепловые карты создавали в программе R statistic (v2.8.1.) с использованием решетки (v0.17-20) и решетки Extra (v0.5-4). Функциональный анализ выполняли, используя ресурсы NIAID's DAVID (v2008).

Подтверждение результатов гибридизации микрочипов количественной RT-PCR. С помощью количественной RT-PCR оценивали уровень мРНК таких генов как *Adar*, *Egr2*, *Slc40a1*, *Mrpl39*, *Slc6a12*, *Lcn2*, *Arc*, *Dusp1*, *Purb*, *Cyr61*, *Igf1* и *eiF4ebp2*. Подготовка кДНК производилась, используя набор обратной транскрипции Omniscript (Qiagen, Valencia, CA). Количественная RT-PCR осуществлялась в четырех дублях для каждого образца, используя 50 мл раствора ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA). Цикл количественной RT-PCR состоял из активации AmpErase UNG (50°C, 2 min), Taq активации (95°C, 10 min), 40 циклов денатурации (50°C, 2 min), и элонгации (60°C, 1

мин), в течение которой оценивали флуоресценцию образцов. Уровень экспрессии генов нормализовали по отношению к *Gapdh* и β -актину. Корреляционный анализ между данными, полученными при гибридизации микрочипов (кратные изменения, представленные в \log_2) и количественной RT-PCR (кратные изменения при нормализации к *Gapdh* и β -актину, представленные в \log_2 ; значения, выраженные как относительно нормализованная экспрессия) производился с помощью программы R (v2.9.1).

3.4. Микродиализ *in vivo*

Микродиализ проводили согласно ранее описанному методу (Niwa et al., 2010) с небольшими изменениями. Мышей анестезировали с помощью авертина, затем имплантировали канюлю (CXG-6, EICOM, Kyoto, Japan) в стриатум (ориентация: переднезадняя +0.5 мм; медиолатеральная +2.0 мм и дорсовентральная -2.5 мм от точки Брегмы) согласно атласу (Franklin and Paxinos, 1997), закрепляя ее с помощью винтов из нержавеющей стали и стоматологического акрилового цемента. Спустя сутки после имплантации канюли в нее вставляли диализный зонд (CX-I-6-02; 2-mm membrane length; EICOM) и производили постоянную перфузию раствором Рингера (147 мМ NaCl, 4 мМ KCl and 2.3 мМ CaCl₂) со скоростью 1 мкл/мин. Диализаты собирались за 10 минут и затем вводились в систему высокоэффективной жидкостной хроматографии (EICOM) для оценки уровня дофамина. Производили шесть измерений для установления базового уровня дофамина перед введением экспериментальному животному амфетамина (0.5 мг/кг, подкожно). Использовали следующие хроматографические показатели: колонка Eicom PP-ODS (4.6 ID × 30 mm), скорость мобильной фазы 500 мкл/мин, применяемые потенциалы: +400 мВ по сравнению с Ag/AgCl, рабочий электрод Eicom WE-3G, время постоянной фильтрации 1.5 сек, температурный режим системы 25°C.

3.5. Иммуногистохимия

После анестезией пентобарбиталом (120 мг/кг) мышей перфузировали 4% раствором периодата-лизина-параформальдегидом при 4°C. Затем делали сагитальные срезы парафиновых образцов мозга 5-8 мкм толщиной, де-парафинировали срезы при обработке ксиленом и регидрировали этанолом. После блокировки срезов раствором Dako, срезы инкубировали с первичными антителами в течение 15 часов (метка для делящихся клеток - rabbit anti-ki67, Lab Vision, 1:200; метка для нейронов - anti-NeuN, Chemicon, 1:200; метка для глиальных клеток - anti-GFAP, COVANCE, 1:200), затем проводили инкубацию с вторичными антителами (goat anti-rabbit IgG, Vector Labs, 1:200) и третичными антителами (ABC, Vector labs, 1:50). Детекцию DAB окраски (коричневый цвет) регистрировали с помощью микроскопа Aperio ScanScopeXT (Aperio Technologies, USA). Апоптоз оценивали с помощью метки TUNEL (Roche Applied Science), используя

инструкцию производителя. Меченные клетки идентифицировали и анализировали с помощью программы Aperio ImageScore. Использовали минимум по 4 животных для каждой экспериментальной группы (генотип, препарат) и четыре среза на каждое животное.

Конфокальная микроскопия. После анестезии и перфузии, как описано выше, выделяли головной мозг, помещали в 4% параформальдегид (ПФА) на 24 часа и делали сагиттальные срезы 100 мкм толщиной на вибраторе. Затем срезы мозга помещали в 4% раствор бычьего сывороточного альбумина, 0.1% Тритон-X 100, натрий-фосфатный буфер на 15 минут. Превичные антитела (rabbit anti-LCN2 polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:100 и mouse anti-GFAP (1:250) инкубировали как свободно плавающие срезы 48 часов при 4°C. Затем срезы промывались 3 раза по 10 минут в растворе блокирующим пермеабиллизацию и инкубировали со вторичными антителами (rabbit LCN2-CY5, 1:200 или mouse GFAP-CY2, 1:200) 2 часа при 20°C. После инкубации срезы промывали (3 x 10 минут), и фиксировали на стекло для приготовления слайда. Для количественной оценки использовали 3-5 мышей на генотип и 4 среза на мыш. Все меченые срезы просматривали на конфокальном микроскопе (Zeiss LSM 510), изображения были зафиксированы при постоянных настройках конфокального микроскопа и анализировались, используя программу Nikon EZ-C1 FreeViewer v3.9.

3.6. Фармакологические препараты

Клозапин (3 мг/кг; Tocris), галоперидол (0.4 мг/кг, 0.8 мг/кг; Tocris), TDZD-8 (2.5 мг/кг, 7.5 мг/кг, 15 мг/кг) растворяли в физиологическом растворе, содержащем 0.3% Tween 20 (BioRad). Бупропион (4 мг/кг; Sigma) растворяли в дистиллированной воде. Ролипрам (0.5 мг/кг; Sigma) растворяли в физиологическом растворе, содержащем 10% DMSO. D-амфетамин сульфат (0.5 мг/кг, 1.0 мг/кг, 2.5 мг/кг, подкожно, Sigma-Aldrich, Oakville, Ontario, Canada; дозы рассчитывали как соединение соли), вальпроат (200 мг/кг) растворяли в физиологическом растворе. Все препараты приготавливали в день эксперимента и вводили интраперитонеально (за исключением амфетамина, который вводили подкожно) в объеме 10 мл/кг. Используемые препараты вводили за 30 минут до тестирования, за исключением TDZD-8, который вводили за 5 минут до тестирования, и амфетамина, который вводили непосредственно перед тестированием. Доза клозапина была выбрана на основе литературы (Lipina et al., 2005). Дозы галоперидола, бупропиона, ролипрама, TDZD-8 и вальпроата были выбраны согласно литературе (David et al., 2003; Egashira et al., 2005; Pouzet et al., 2005; Zhang et al., 2002; Beaulieu et al., 2004; Tremolizzo et al 2005). При оценке эффектов препаратов в тесте латентного торможения, их вводили перед каждой сессией - пре-экспозицией и обуславливанием. В тесте «Вынужденного

плавания» ролипрам вводили 8 дней и за 30 мин перед тестированием. Вальпроат вводили дважды в день в течение 14 дней (Tremolizzo et al., 2005).

Введение PolyI:C и антител к интерлейкину-6 (ИЛ-6): PolyI:C (в форме соли натрия; Sigma-Aldrich) растворяли в буфере PBS (5 мг/кг и 2.5 мг/кг) и вводили в хвостовую вену при слабом физическом ограничении движения в объеме 5 мл/кг. Экспериментальным животным (самки WT и 100P/100P на 9 день беременности) внутривенно вводили 2.5 мг/кг polyI:C, часть животных получала также совместно с polyI:C 100 мкг антител к ИЛ-6 (anti-IL-6; rat IgG1; R&D Systems) свежерастворенных в 200 мкл PBS (Smith et al., 2007). Контрольные животные получали введение 200 мкл PBS.

3.7. Статистическая обработка

Статистическую обработку проводили с использованием пакета программ Statistica10 for Windows 8. Полученные данные были проанализированы с помощью одно- и двухфакторного анализа ANOVA, с повторными измерениями, где необходимо, и дальнейшим ретроспективным (post-hoc) анализом (LSD критерий Фишера).

ГЛАВА 4. ФЕНОТИПИРОВАНИЕ DISC1 МУТАНТНЫХ МЫШЕЙ

4.1. Создание двух генетических линий мышей с мутациями во 2м экзоне гена DISC1

Ген *DISC1* состоит из 13 экзонов, среди которых 2 экзон является наиболее продолжительным; он представлен во всех известных изоформах *DISC1* и кодирует основную часть «головного» домена белка *DISC1*. Генетическая ассоциация между шизофренией, шизоаффективным расстройством и дефицитом рабочей памяти были найдены для пациентов с гаплотипами, охватывающими 2 экзон *DISC1* (Cannon et al., 2005; Hennah et al., 2005; Maeda et al., 2006).

При сотрудничестве с биоцентром RIKEN был отсканирован 2 экзон *DISC1* на мутации у 1681 самцов-потомков 1го поколения, полученного от скрещивания ENU-мутагенизированных C57BL/6Jcl самцов с DBA/2Jcl самками, которые не получали введения ENU мутагена. Мутантный транскрипт *DISC1*^{Rgsc1393} имел 127A – Т трансверсию (Рис. 2А), что приводило к замене аминокислоты глутамин (Q) на лейцин (L) в позиции 31 аминокислоты протеина *DISC1*. В то время как мутантный транскрипт *DISC1*^{Rgsc1390} имел 334Т – С трансверсию (Рис. 2Б), вызывая замену аминокислоты лейцин (L) на пролин (P) в позиции 100 аминокислоты протеина *DISC1*. Последовательность 2 экзона у мышей линии C57BL/6Jcl и DBA/2Jcl идентична, предполагая, что обе точечные мутации возникли вследствие введения ENU мутагена. Затем, гетерозигот N2, потомки скрещивания выявленных самцов-мутантов Q31L и L100P с самками дикого типа C57BL/6Jcl, скрещивали с мышами C57BL/6J инбредной линии в течение 4х поколений (N3-N6), чтобы геном N6 поколения на 98.4375% соответствовал C57BL/6J инбредной линии. Гетерозиготы 6го поколения скрещивали между собой для создания гомозиготных (31L/31L; 100P/100P), гетерозиготных (31L/+; 100P/+) и гибридных (Q31L/L100P) мышей, для дальнейшего фенотипирования. Животные всех исследуемых генотипов жизнеспособны и не отличались от мышей дикого типа по морфо-анатомическим признакам.

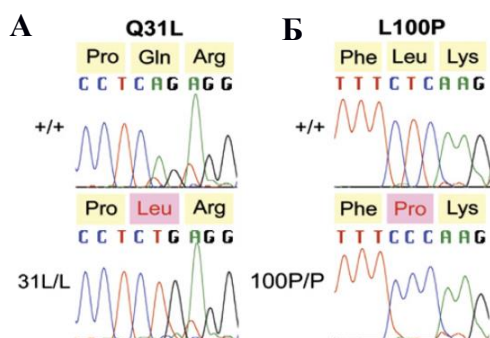


Рис. 2А-Б. Хроматограмма ДНК последовательности, иллюстрирующая точечные мутации во 2м экзоне гена *DISC1*. **А.** Трансверсия 127А – Т меняет кодон CAG, кодирующий глутамин (Gln) на кодон CTG, кодирующий лейцин (Leu) в позиции 31 а.к. *DISC1* белка. **Б.** Трансверсия 334Т – С конвертирует кодон CTC, кодирующий лейцин (Leu) на кодон CCC, кодирующий пролин (Pro) в позиции 100 а.к. *DISC1* протеина.

4.2. Сравнительный анализ поведенческих эндотипов 31L/31L и 100P/100P мутантных мышей

Эмоциональное поведение в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ)

ANOVA не обнаружил достоверного влияния генотипа на процент времени пребывания в открытых, закрытых рукавах лабиринта, на центральной площадке ПКЛ, а также на общее число заходов в отсеки лабиринта (p 's > 0.05) (Табл. 1).

Таблица 1. Основные параметры поведения в тесте ПКЛ

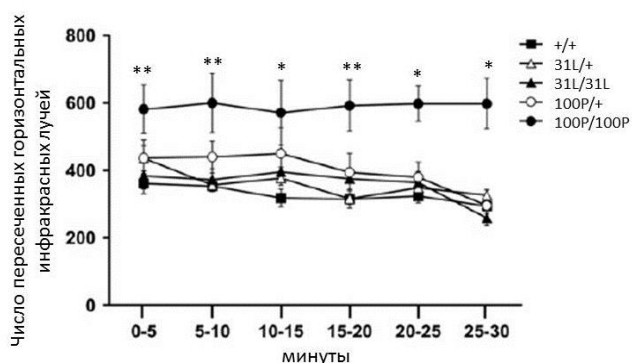
Показатели ПКЛ	WT (n = 27)	31L/+ (n = 25)	31L/31L (n = 13)	100P/+ (n = 23)	100P/100P (n = 15)
Время в открытых рукавах, %	2.9 ± 0.5	3.3 ± 0.7	3.9 ± 0.8	3.1 ± 0.6	3.3 ± 0.5
Время в закрытых рукавах, %	83.4 ± 1.5	79.9 ± 4.0	85.8 ± 2.5	86.1 ± 1.2	81.1 ± 2.6
Время в центре, %	14.0 ± 1.3	16.4 ± 4.2	10.2 ± 1.8	10.5 ± 0.9	15.4 ± 2.6
Общее число заходов в отсеки лабиринта	27.7 ± 1.4	28.5 ± 1.9	24.5 ± 2.6	27.4 ± 2.1	25.2 ± 2.3

Шизофреноподобное поведение 100P/100P линии мышей

Гиперактивность в тесте «Открытое поле»

ANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние генотипа [$F(4,48) = 4.0$; $p < 0.01$] и временных интервалов [$F(5,240) = 6.7$; $p < 0.001$] на горизонтальную активность в данном тесте. Горизонтальная двигательная активность была выше у 100P/100P мутантов на протяжении всех 30 минут ($p < 0.05$ на 10-15, 20-25 и 25-30 минуты по сравнению с мышами дикого типа) (Рис. 3А). Животные всех остальных генотипов не отличались по данному показателю от WT мышей. ANOVA обнаружила также достоверное влияние генотипа на вертикальную активность [$F(4,48) = 3.6$; $p < 0.05$]. 100P/100P мутантные мыши чаще вставали на задние лапы, чем контрольные животные, в первые 10 минут (Рис. 3Б).

А



Б

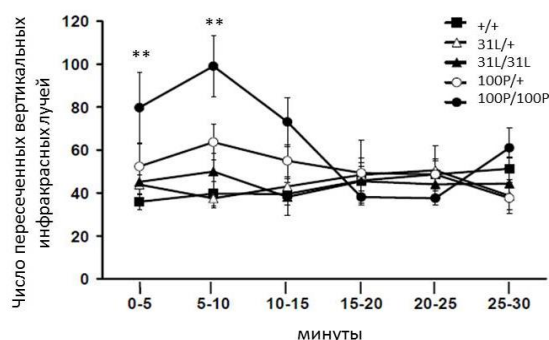


Рис. 3А-Б. Гиперактивность 100P/100P мышей в тесте «открытое поле». (А) Горизонтальная и (Б) вертикальная активность у мышей дикого типа (+/+) (n = 14), 31L/+ (n = 17), 31L/31L (n = 6), 100P/+ (n = 7), 100P/100P (n = 9). * - $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – по сравнению с мышами дикого типа.

Дефицит престаимпульного торможения реакции вздрагивания (PPI)

ANOVA с повторными измерениями выявил достоверный эффект престаимулов [F(2,240) = 4.9; $p < 0.01$], генотипа [F(5,120) = 11.2; $p < 0.001$] и их взаимодействий [F(10,240) = 2.7; $p < 0.01$] на процент престаимпульного торможения реакции вздрагивания. Дефицит престаимпульного торможения наблюдался у мышей 31L/31L, 100P/+, 100P/100P и 31L/100P генотипов по сравнению с контрольными животными дикого типа (Рис. 4А). ANOVA также обнаружил достоверный эффект генотипа на интенсивность реакции вздрагивания без престаимулов [F(5,120) = 4.7; $p < 0.001$] (Рис. 4Б), которая была ниже у мышей 100P/+, 100P/100P и 31L/100P генотипов по сравнению с WT мышами. Корреляционный анализ не выявил достоверной зависимости процента престаимпульного торможения реакции вздрагивания от интенсивности вздрагивания ($r = 0.16$; $p = 0.14$). Дефицит престаимпульного торможения у 100P/+ и 100P/100P мышей не связан с нарушением слуха, поскольку порог слуховой реакции ствола головного мозга у 100P/100P мышей (40 ± 2.6) не отличался от мышей дикого типа (46 ± 5.1).

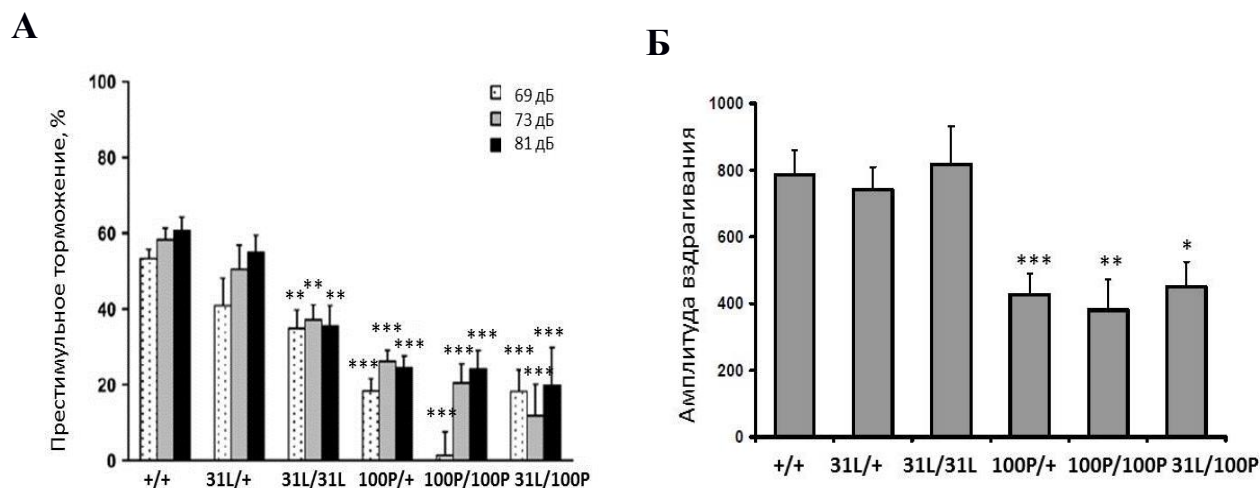


Рис. 4А-Б. Дефицит престаимпульного торможения реакции вздрагивания у мышей линий 31L/31L, 100P/+, 100P/100P и 31L/100P. **А.** Процент престаимпульного торможения реакции вздрагивания в ответ на 120 дБ (стимул, вызывающий реакцию вздрагивания) при комбинации престаимулов (69 дБ, 73 дБ, 81 дБ). **Б.** Интенсивность вздрагивания в ответ на 120 дБ.

Дефицит латентного торможения памяти страха

Мыши изучаемых генотипов не отличались от контрольных животных по питьевому поведению (Рис. 5А-Б) во время сессии приучения животных к питью в оперантной камере, а также по скорости выполнения 25 «слизываний» (50-75) перед подачей обусловленного тона в день тестирования. MANOVA выявил достоверный эффект фактора пре-экспозиции (ПЭ) к тону [F(1,96) = 11.2; $p < 0.001$], а также генотипа

[F (4,96) = 4.2; p < 0.01] на коэффициент подавления питья. Дефицит латентного торможения продемонстрировали 31L/31L, 100P/+ и 100P/100P линии мышей (Рис. 6), однако память страха (замирание в ответ на обусловленный тон и увеличение времени выполнения 25 «слизываний») проявили экспериментальные мыши без пре-экспозиции (БПЭ) всех генотипов, исключая общие когнитивные нарушения.

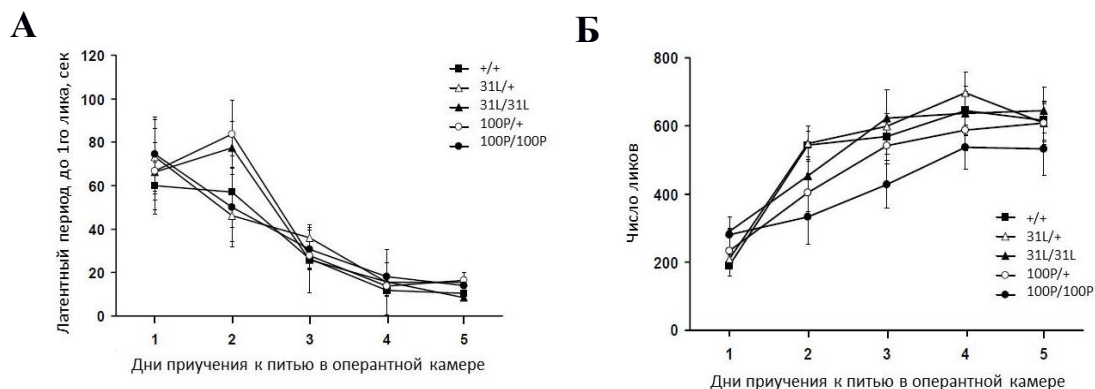


Рис. 5А-Б. Питьевое поведение у мышей изучаемых генотипов (+/+ (n = 13 ПЭ, 8 БПЭ), 31L/+ (n = 16 ПЭ, 16 БПЭ), 31L/31L (n = 9 ПЭ, 8 БПЭ), 100P/+ (n = 11 ПЭ, 11 БПЭ) и 100P/100P (n = 7 ПЭ и 7 БПЭ)) во время приучения к питью в оперантной камере. **А.** Латентный период до 1го «слизывания»; **Б.** Общее число «слизываний», выполненных во время ежедневных сессий в течение 5 дневного приучения к питью.

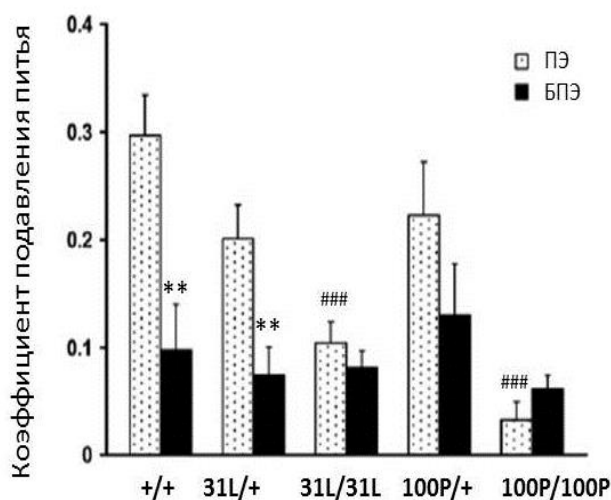


Рис. 6. Латентное торможение памяти страха у мышей изучаемых генотипов (+/+ (n = 13 ПЭ, 8 БПЭ), 31L/+ (n = 16 ПЭ, 16 БПЭ), 31L/31L (n = 9 ПЭ, 8 БПЭ), 100P/+ (n = 11 ПЭ, 11 БПЭ) и 100P/100P (n = 7 ПЭ и 7 БПЭ)). Латентное торможение выражается в разнице коэффициента подавления питья между экспериментальной группой с пре-экспозицией к тону (ПЭ) по сравнению с группой без пре-экспозиции (БПЭ). ** - p < 0.01 – по сравнению с ПЭ внутри генотипа; ### - p < 0.001 – по сравнению с ПЭ мышей дикого типа.

Дефицит рабочей памяти в «Т-образном лабиринте»

ANOVA выявил достоверный эффект генотипа [F (2,22) = 7.56; p < 0.01] на выбор правильного рукава лабиринта. 100P/100P мутантам требовалось существенно больше времени, чем мышам дикого типа и 31L/31L, чтобы осуществлять правильный выбор в течение 3х последовательных дней (критерий обучения 70%) (Рис. 7А). ANOVA выявил достоверное влияние генотипа [F (2,22) = 9.6; p < 0.001] на выбор правильного рукава

лабиринта. Мутантные мыши 31L/31L и 100P/100P существенно реже выбирали правильный рукав Т-лабиринта при кратковременных интервалах (5 секунд и 10 секунд) по сравнению с мышами дикого типа (Рис. 7Б), однако не отличались от контрольных животных по данному показателю при 30 секундном интервале.

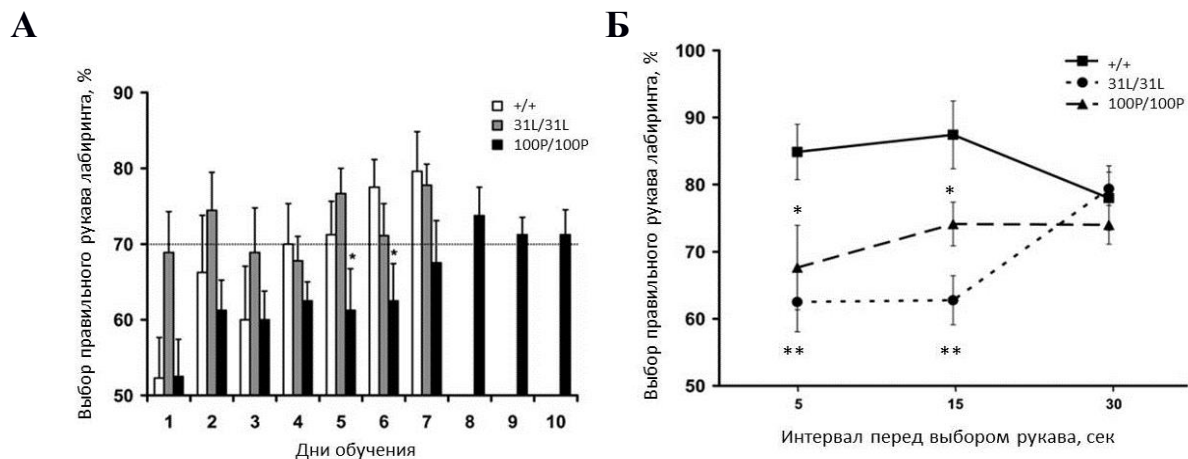


Рис. 7А-Б. Поведение в «Т-образном лабиринте». **А.** Сессия обучения мышей трех генотипов (дикий тип (+/+, n = 9; 31L/31L, n = 8; 100P/100P, n = 8) осуществления правильного выбора рукава лабиринта. **Б.** Оценка рабочей памяти при использовании 5 сек., 10 сек. и 30 сек. интервалов перед выбором рукава лабиринта. 50% выбор является случайным. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с мышами дикого типа.

Пространственное обучение и память в тесте «Водный лабиринт Морриса»

ANOVA с повторными измерениями не обнаружил достоверного влияния генотипа как на латентный период нахождения платформы в данном тесте, так и на процент времени, проведенном в сегменте, где накануне находилась платформа (П) (p 's > 0.05) (Рис. 8А-Б).

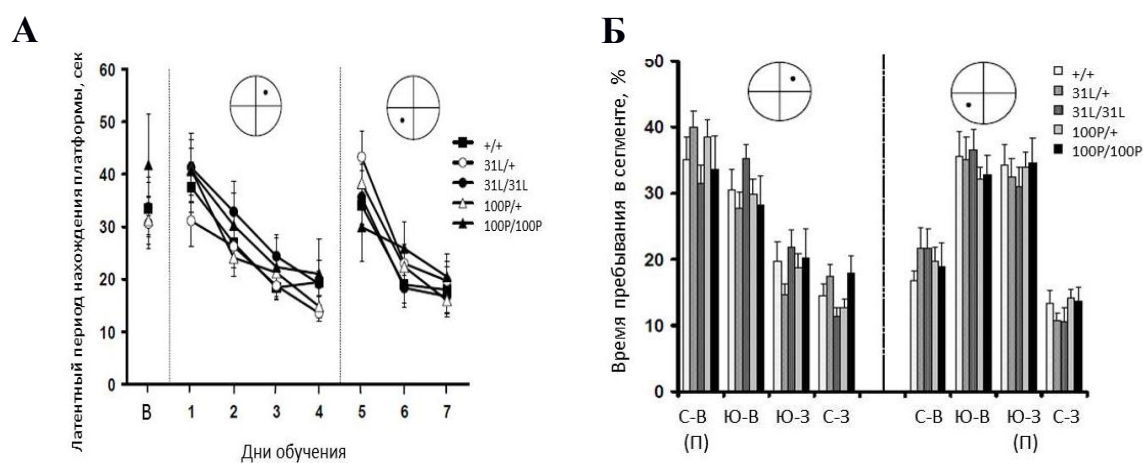


Рис. 8А-Б. Пространственное обучение и переучивание (**А**) и пространственная долговременная память (**Б**) у мышей дикого типа (+/+, n = 17; 31L/+, n = 24; 31L/31L, n = 11; 100P/+, n = 21; 100P/100P, n = 19). Местоположения платформы (П): С-В – северо-восток, Ю-В – юго-восток, Ю-З – юго-запад, С-З – северо-запад.

Депрессивно-подобное поведение 31L/31L линии мышей

Повышенное «поведенческое отчаяние» в тесте «Принудительного плавания»

ANOVA выявил достоверное влияние генотипа [$F(4,86) = 3.3$; $p < 0.05$]. Продолжительность дрейфа в данном тесте была выше у 31L/31L мышей (Рис. 9А) по сравнению с контрольными животными. Для подтверждения полученного результата был применен 2х-дневный протокол данного теста на независимой когорте мышей. ANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние генотипа [$F(2,25) = 44.1$; $p < 0.001$], дня тестирования [$F(1,25) = 25.6$; $p < 0.001$] и их взаимодействия [$F(2,25) = 5.6$; $p < 0.05$]. Мыши всех изучаемых генотипов продемонстрировали повышенный дрейф на 2й день (Рис. 9Б), но 31L/31L мутанты проявили повышенный дрейф в течение обоих дней тестирования.

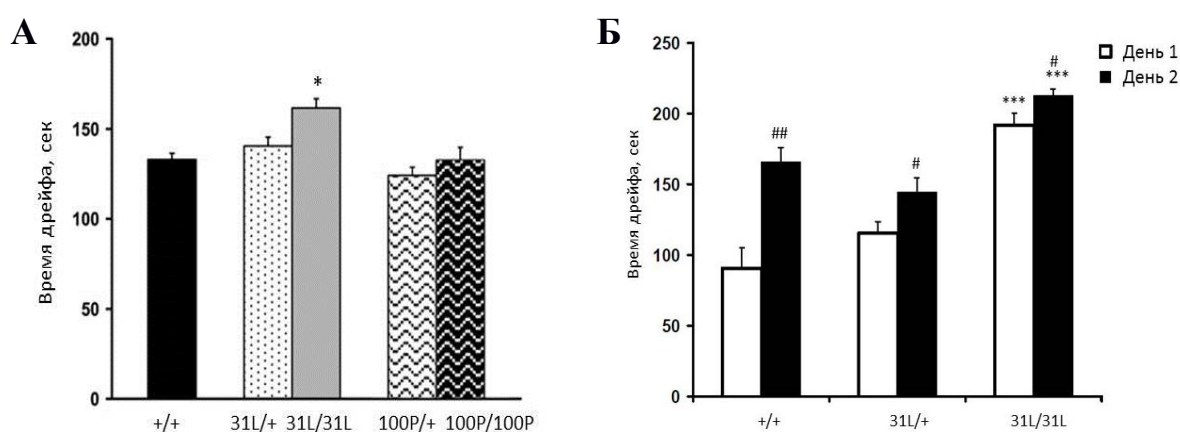


Рис. 9А-Б. Поведение в тесте «Принужденное плавание» мышей генотипов (+/+ (n = 27, 8), 31L/+ (n = 20, 8), 31L/31L (n = 10, 15), 100P/+ (n = 21) и 100P/100P (n = 13) в (А) однодневном и (Б) двухдневном протоколе данного теста. * - $p < 0.05$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с мышами дикого типа (+/+); # - $p < 0.05$; ## - $p < 0.01$ – по сравнению с 1м днём внутри каждого генотипа.

Дефицит социальной мотивации и социального распознавания

ANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние генотипа [$F(4, 28) = 9.6$; $p < 0.001$] и присутствие «партнёра 1» [$F(1,28) = 4.1$; $p < 0.01$] на время пребывания возле отсека с «партнёром 1». Мыши 31L/+ и 31L/31L генотипов проводили одинаковое количество времени как возле пустого отсека установки, так и возле отсека с «партнёром 1» (Рис. 10А), в то время как мыши дикого типа и 100P/+ и 100P/100P генотипов продемонстрировали предпочтение «партнёра 1».

ANOVA с повторными измерениями обнаружил существенное влияние генотипа [$F(4,28) = 7.9$; $p < 0.001$], присутствие незнакомого «партнёра 2» [$F(1,28) = 5.9$; $p < 0.05$] и также их взаимодействия [$F(4,28) = 4.8$; $p < 0.01$]. Мутантные мыши 31L/+ и 31L/31L

генотипов в равной степени проявили интерес к знакомому «партнёру 1» и новому «партнёру 2» (Рис. 10Б), а мыши дикого типа и 100P/+ и 100P/100P генотипов предпочитали больше времени оставаться возле «партнёра 2». Двигательная активность не отличалась в данном тесте, т.к. число заходов в каждый отсек установки достоверно не отличалось у мышей исследуемых генотипов по сравнению с контролем в обеих сессиях (p 's > 0.05). Функционирование обонятельных луковиц также было сопоставимо у мышей всех изучаемых генотипов (Рис. 11), исключая дефицит обоняния у 31L/+ и 31L/31L мышей.

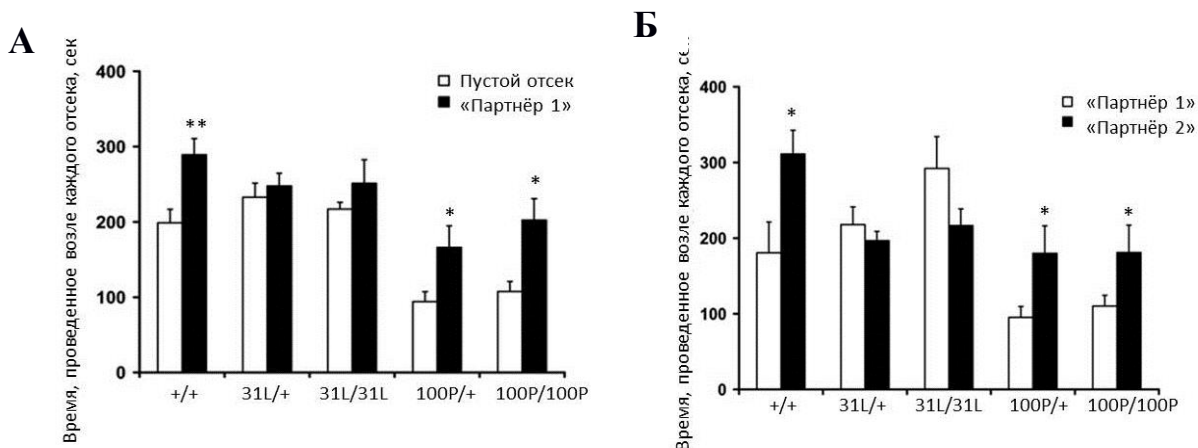


Рис. 10А-Б. Социальная мотивация и распознавание у мышей +/+ (n = 6), 31L/+ (n = 8), 31L/31L (n = 6), 100P/+ (n = 7), 100P/100P (n = 7). **А.** Среднее время, проведенное возле отсеков установки в реакцию на незнакомого «партнёра 1» по сравнению с пустым отсеком. **Б.** Среднее время, проведенное возле отсеков установки в ответ на незнакомого «партнёра 2» по сравнению со знакомым «партнёром 1». * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с пустым отсеком/«партнёром 1» внутри каждого генотипа.

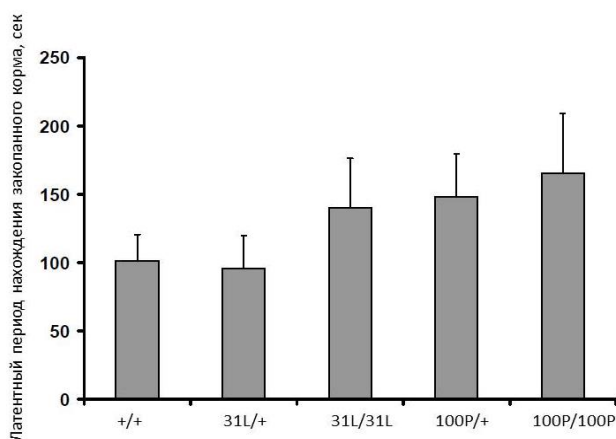


Рис. 11. Латентный период нахождения закопанных пищевых гранул (секунды) у мышей изучаемых генотипов (+/+, n = 8; 31L/+, n = 6; 31L/31L, n = 7; 100P/+, n = 6 и 100P/100P, n = 6).

Дефицит предпочтения 10% сахарозы

ANOVA обнаружил достоверное влияние генотипа [$F(2,17) = 28.4$; $p < 0.001$], дня тестирования [$F(3,51) = 5.4$; $p < 0.01$] и их взаимодействий [$F(6,51) = 8.4$; $p < 0.001$] на

предпочтение сахарозы. 31L/31L мыши существенно меньше потребляли 10% раствор сахарозы, чем мыши дикого типа или 100P/100P, начиная со 2го дня тестирования (Рис. 12А). При этом не было обнаружено межгенетических отличий по общему потреблению воды (Рис. 12Б) и чувствительности к сахарозе (Рис. 12В).

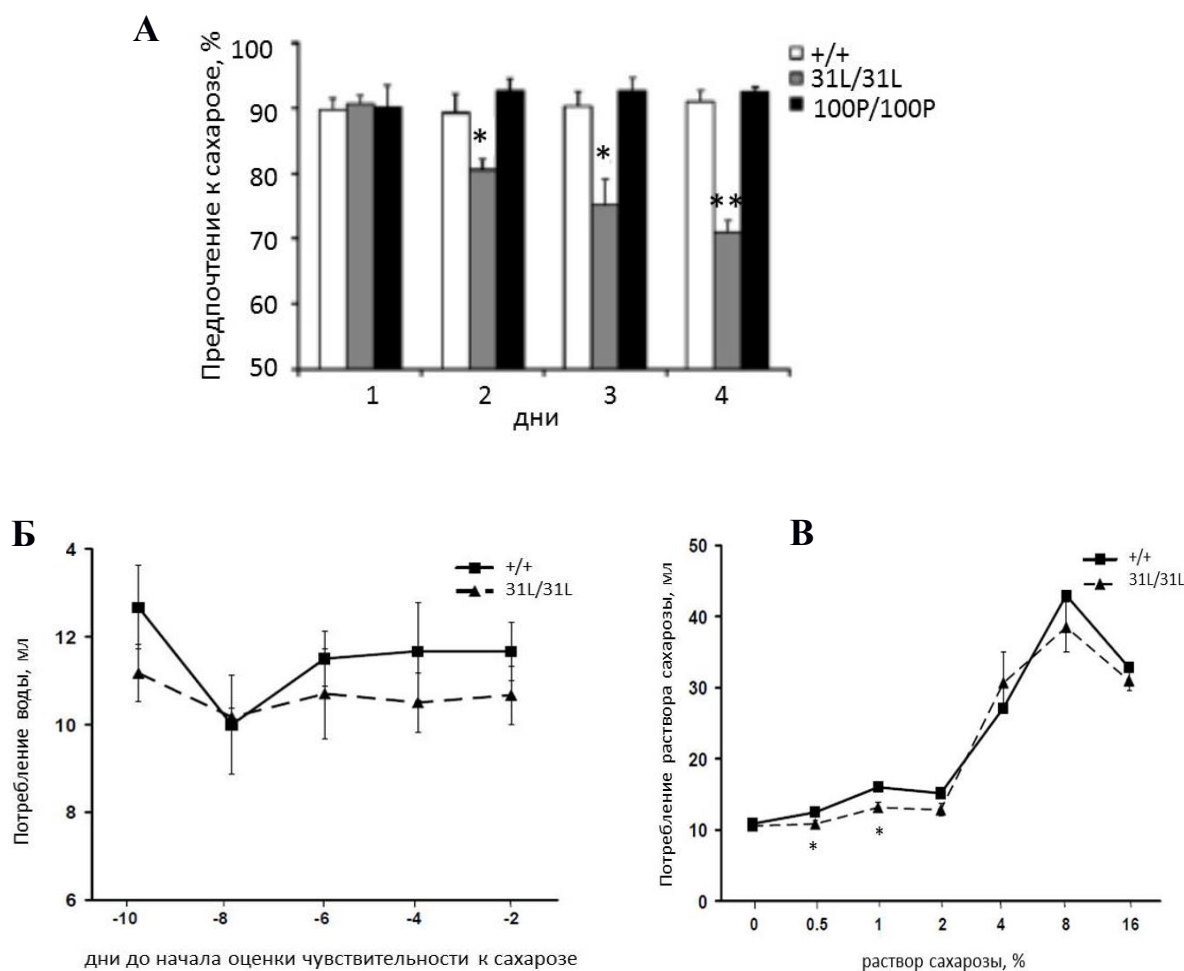


Рис. 12А-В. А. Снижение предпочтения к 10% раствору сахарозу у мышей линии 31L/31L (n = 6), но не у линии 100P\100P (n = 6) по сравнению с мышами дикого типа (+/+; n = 8). Б. Базовый уровень потребления воды у мышей изучаемых генотипов (+/+, n = 8) и (31L/31L, n = 6), оцениваемый в течение 10 дней до начала теста на чувствительность к сахарозе. В. Потребление раствора сахарозы различной концентрации. * - $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ – по сравнению с +/+ мышами.

4.3. Фармакологические эффекты антидепрессантов и антипсихотиков на поведение 31L/31L и 100P/100P линий мышей

Влияние клозапина (3 мг/кг), галоперидола (0.4 мг/кг), бупропиона (4 мг/кг), ролипрама (0.5 мг/кг) на дефицит престаимпульного торможения у DISC1 мутантных мышей.

MANOVA идентифицировал влияние генотипа [$F(4,290) = 23.4$; $p < 0.001$], фармакологических препаратов [$F(4,290) = 6.2$; $p < 0.001$] и их взаимодействий [$F(16,290)$]

= 5.2; $p < 0.001$] на престаимульное торможение реакции вздрагивания. Как оказалось, антипсихотики не оказали действия на дефицит престаимульного торможения у линии 31L/31L, в то время как клозапин и галоперидол существенно улучшали нарушение престаимульного торможения у линии 100P/100P ($p < 0.01$ и $p < 0.001$, соответственно (Рис. 13). В то время как введение ролипрама 100P/+ и 100P/100P восстановило их дефицит престаимульного торможения до контрольного уровня.

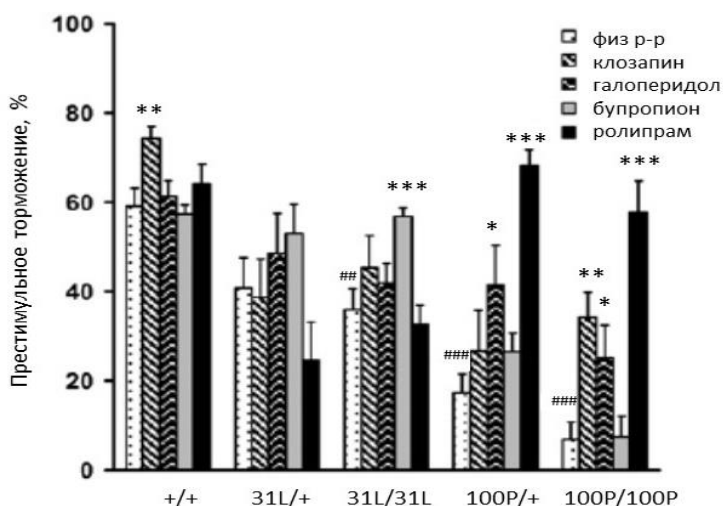


Рис. 13. Фармакологическая эффективность антипсихотиков, антидепрессантов и ролипрама на дефицит престаимульного торможения реакции вздрагивания у DISC1 мутантных мышей и мышей дикого типа (+/+). Данные представлены в виде среднего значения трех престаимулов для каждой экспериментальной группы +/+ (n = 11-16); 31L/+ (n = 10-24); 31L/31L (n = 10-16); 100P/+ (n = 10-22); 100P/100P (n = 11-17). * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с введением физ. р-ра внутри каждого генотипа; ## - $p < 0.01$; ### - $p < 0.001$ – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. р-ра.

Влияние клозапина (3 мг/кг) на дефицит латентного торможения у DISC1 мутантных мышей.

MANOVA выявил достоверное влияние фактора генотипа [$F(3,102) = 3.1$; $p < 0.05$], препарата [$F(1,102) = 7.8$; $p < 0.01$], пре-экспозиции [$F(1,102) = 39.5$; $p < 0.001$], а также взаимодействия генотипа x препарата x пре-экспозиции [$F(3,102) = 7.7$; $p < 0.001$]. Мыши дикого типа на фоне физ. раствора и клозапина продемонстрировали латентное торможение ($p < 0.01$ и $p < 0.001$, соответственно; Рис 14). Клозапин не оказал действия на мышей линии 31L/31L и 100P/+, в то время как ПЭ группа (с пре-экспозицией к тону) 100P/100P мышей на фоне введения клозапина существенно игнорировала обусловленный тон, повышая тем самым коэффициент подавления питья, что в результате приводило к латентному торможению ($p < 0.01$; Рис. 14).

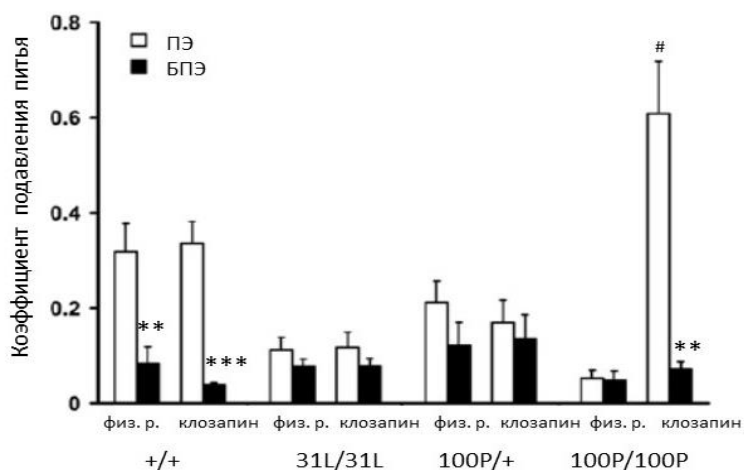


Рис. 14. Фармакологический эффект клозапина на дефицит латентного торможения у 100P/100P мышей и мышей дикого типа (+/+). Латентное торможение выражается в разнице коэффициента подавления питья между экспериментальной группой с пре-экспозицией к тону (ПЭ) по сравнению с группой без пре-экспозиции к тону (БПЭ). (+/+ ПЭ и БПЭ мыши на фоне физ. раствора и клозапина (n = 7, 10 и n = 8,7); 31L/31L (n = 6,6 и n = 6,6); 100P/+ (n = 6,6 и n = 11,9); 100P/100P (n = 6,6 и n = 7,6). ** - p < 0.01; *** - p < 0.001 – по сравнению с ПЭ группой внутри каждой экспериментальной группы; # - p < 0.05 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. р-ра.

Влияние клозапина (3 мг/кг) на двигательную активность у DISC1 мутантных мышей.

MANOVA выявил достоверное влияние фактора генотипа [F (1,36) = 27.8; p < 0.001], препарата [F (1,36) = 14.2; p < 0.001], и взаимодействия генотипа x временного интервала [F (10,180) = 2.3; p < 0.01] на двигательную активность. Клозапин понижал моторную активность у мышей всех исследуемых генотипов (Рис. 15).

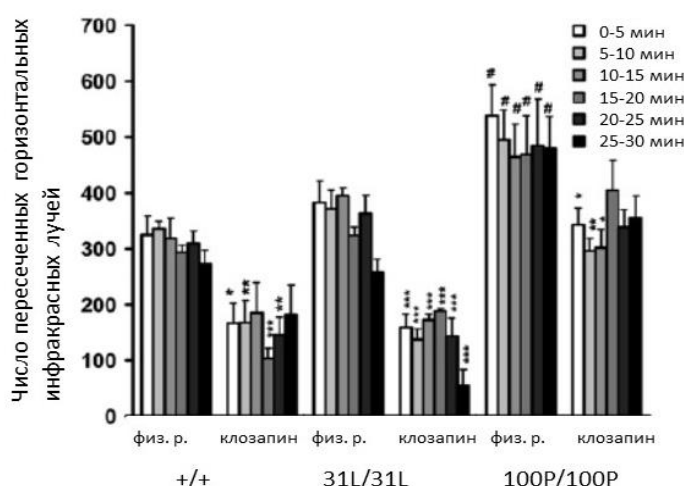


Рис. 15. Фармакологический эффект клозапина на двигательную активность у DISC1 мутантных мышей и мышей дикого типа (+/+). +/+ мыши на фоне физ. раствора и клозапина (n = 7, 8); 31L/31L (n = 6,6); 100P/100P (n = 8, 10). ** - p < 0.01; *** - p < 0.001 – по сравнению с ПЭ группой внутри каждой экспериментальной группы; # - p < 0.05 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. р-ра.

Влияние антидепрессанта - бупропиона (4 мг\кг) и ролипрама (0.5 мг\кг) на депрессивно-подобное поведение мышей линии Q31L/Q31L

MANOVA выявил достоверное влияние генотипа [$F(1,38) = 10.6; p < 0.001$] и препаратов [$F(2,38) = 5.1; p < 0.01$] на продолжительность дрейфа в тесте «Принужденное плавание». 31L/31L мутантные мыши на фоне введения физиологического раствора продемонстрировали повышенную продолжительность иммобильности ($p < 0.01$) по сравнению с контрольными животными (Рис. 16). Введение бупропиона достоверно снижало продолжительность дрейфа у мышей линии Q31L/Q31L ($p < 0.01$), в то время как введение бупропиона и ролипрама снижало иммобильность у мышей дикого типа ($p < 0.05$).

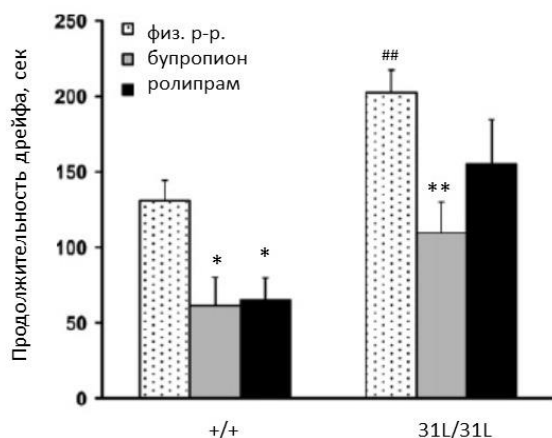


Рис. 16. Фармакологический эффект бупропиона (острое введение) и ролипрама (введение в течение 8 дней) на «поведенческое отчаяние» у 31L/31L мутантных мышей и мышей дикого типа (+/+). +/+ мыши на фоне физ. раствора, бупропиона и ролипрама ($n = 6-8$); 31L/31L ($n = 7-9$). * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с физ. р-ром внутри каждого генотипа; ## - $p < 0.01$ – по сравнению с +/+ мышами на фоне

Заключение к Главе 4

Таким образом, фармако-поведенческий анализ выявил шизофреноподобное поведение у мышей линии 100P/100P и депрессивно-подобное поведение у 31L/31L мутантных животных. Следовательно, можно предположить, что действие каждой точечной мутации во 2-м экзоне гена DISC1, по-видимому, вызывает специфические биохимические изменения, приводящие к тому или иному типу психопатологии. Поэтому на следующем этапе исследования представлялось важным исследовать биохимические особенности, приводящие к шизофреноподобному поведению у мышей линии 100P/100P.

Глава 5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГОЛОВНОГО МОЗГА МЫШЕЙ ЛИНИИ 100P/100P

5.1. Повышенная фармакологическая чувствительность 100P/100P мышей к амфетамину

MANOVA с повторными измерениями выявил достоверное влияние фактора препарата [$F(3,49) = 18.1$; $p < 0.001$], генотипа [$F(1,49) = 18.8$; $p < 0.001$], временного интервала [$F(11,539) = 10.8$; $p < 0.001$], препарат \times временной интервал [$F(33,539) = 3.5$; $p < 0.001$], генотип \times временной интервал [$F(11,539) = 3.5$; $p < 0.001$] и генотип \times препарат \times временной интервал [$F(33,539) = 1.8$; $p < 0.05$] взаимодействий на пройденное расстояние в установке «открытого поля». Амфетамин в низкой дозе (0.5 мг/кг) достоверно повышал двигательную активность у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 17Б), не оказывая действия на данный показатель у мышей дикого типа. Амфетамин в дозах 1 мг/кг и 2.5 мг/кг оказывал стимулирующее действие на двигательную активность животных двух исследуемых генотипов (Рис. 17В,Г), хотя выраженность действия психостимулянта в дозе 1 мг/кг на 100P/100P мышей сохранялась более высокой, чем у контрольной линии.

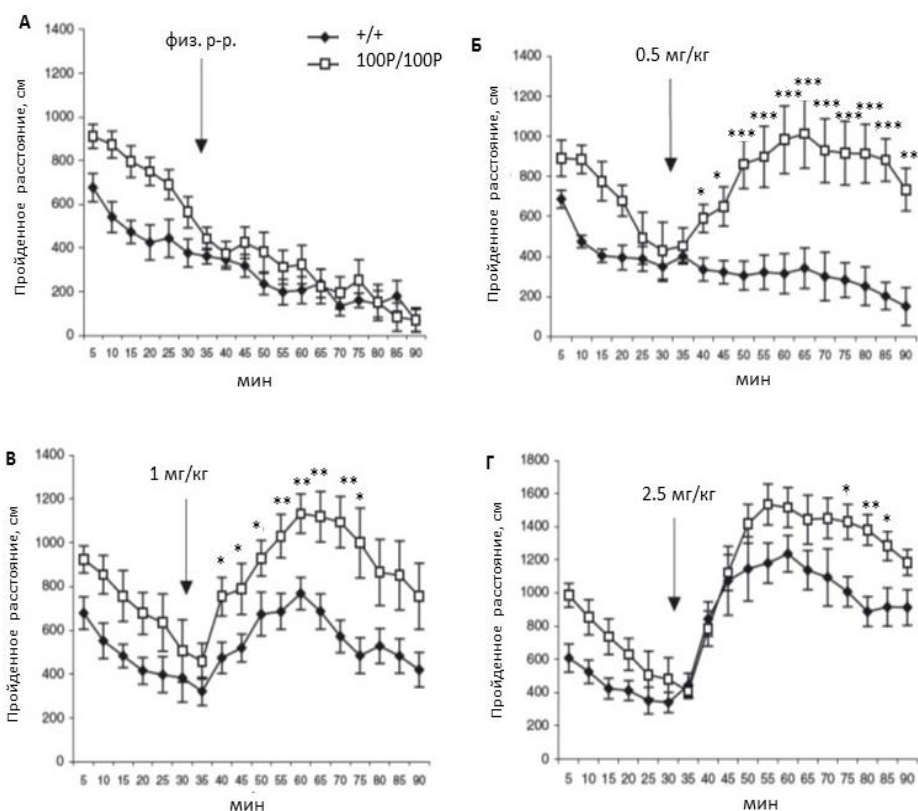


Рис. 17А-Г. Эффекты острого введения амфетамина (0.5 мг/кг; 1 мг/кг; 2.5 мг/кг) на двигательную активность мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантов в тесте «Открытое поле». Амфетамин повышал моторную активность в дозо-зависимой мере у мышей дикого типа (+/+; $n = 7-10$) и 100P/100P ($n = 7-9$) (А-Г), но только амфетамин в низкой дозе (0.5 мг/кг) вызывал гиперактивность у мутантных мышей 100P/100P (Б). * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с мышами дикого типа (+/+).

Для подтверждения найденного феномена была оценена чувствительность к амфетамину в низкой дозе у мутантных мышей 100P/100P в тесте «Престимульное торможение реакции вздрагивания». MANOVA с повторными измерениями выявил достоверный эффект генотипа [F (1,28) = 90.3; p < 0.001], препарата [F(1,28) = 4.4; p < 0.05], стимулов [F (2,56) = 106.3; p < 0.001] и препарат x стимулы [F (2,56) = 40.1; p < 0.05] и генотип x препарат x стимулы [F (2,56) = 9.5; p < 0.001] взаимодействий на стимульное торможение реакции вздрагивания. 100P/100P мыши продемонстрировали дефицит стимульного торможения в ответ на все три стимула (Рис 18А). Эффект мутации усугублялся введением амфетамина у 100P/100P мышей, но не у мышей дикого типа +/+. MANOVA также обнаружил эффект генотипа на амплитуду вздрагивания [F(1,28) = 58.3; p < 0.001] (Рис. 18Б) без влияния фактора препарата (p > 0.05).

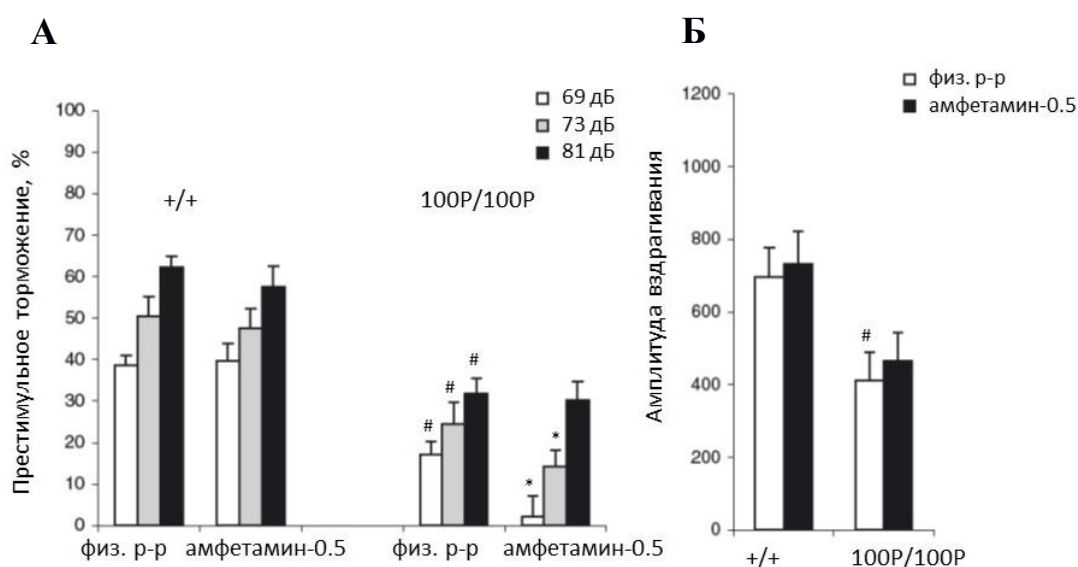


Рис. 18А-Б. Эффекты острого введения амфетамина (0.5 мг/кг) на стимульное торможение реакции вздрагивания (А) и интенсивность вздрагивания (Б) мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантов. Амфетамин усугублял дефицит стимульного торможения у мутантных мышей (n = 7-8), но не у мышей дикого типа (+/+) (n = 8-9). Амфетамин не оказывал действия на амплитуду вздрагивания у животных двух генотипов (Б). * - p < 0.05 – по сравнению с 100P/100P мышами на фоне введения физ. p-ра; # - p < 0.001 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. p-ра.

5.2. Содержание моноаминов в отделах головного мозга

Уровень основных моноаминов и их метаболитов в прилежащем ядре, стриатуме, гиппокампе и фронтальной коре головного мозга не отличался достоверно между исследуемыми генотипами (p's > 0.05) (Табл. 2).

5.4. Плотность дофаминовых рецепторов D2^{high} в стриатуме

Для дальнейшего исследования дофаминовой системы у 100P/100P линии мышей была оценена плотность высокочувствительных дофаминовых рецепторов D2^{high} в гомогенате стриатума. На Рисунке 20 показано конкурентное связывание дофамина и [³H]-домперидона к D2 рецепторам в гомогенате стриатума мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей. Неспецифическое связывание определялось в присутствии 10 μ M сульпирида. Пропорция D2 рецепторов в высокочувствительном состоянии D2^{high} составила в среднем $18 \pm 1.4\%$ в гомогенате стриатума +/+ мышей, в то время как данный показатель составил $38 \pm 1.2\%$ у 100P/100P мышей (t-критерий = - 10.95, $p < 0.001$), т.е. плотность дофаминовых рецепторов D2^{high} повысилась на 113% у мутантных мышей. Общее число замещаемого связывания, т.е. специфическое связывание, определяемое содержанием 10 μ M сульпирида, 2 нМ [³H]-домперидона было 874 ± 62 (дезинтеграция за минуту/на фильтр) в лизате контрольных мышей, что было принято за 100% специфического связывания. Данный показатель у мутантных мышей составил 753 ± 85 (дезинтеграция за минуту/на фильтр) ($p > 0.05$), что достоверно не отличалось от данного параметра у контрольных мышей.

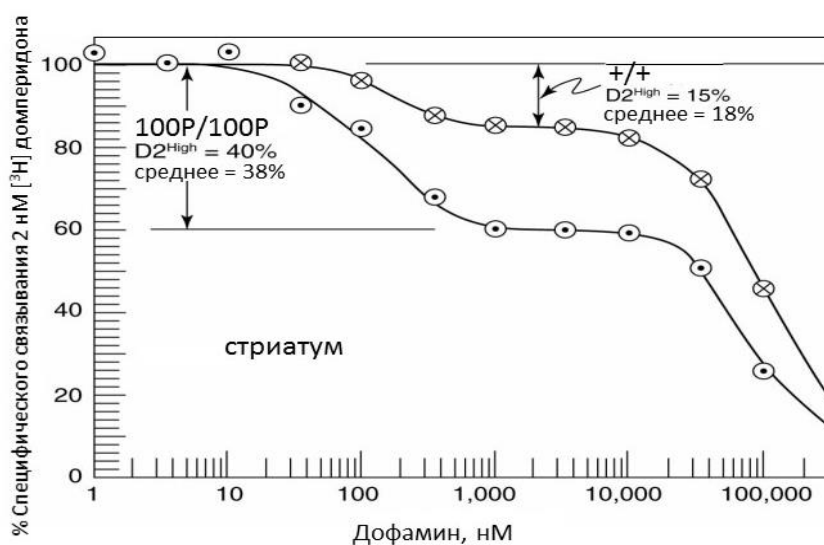


Рис. 20. Конкурентное связывание к D2 рецепторам между дофамином и [³H]-домперидоном в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P. Пропорция D2 рецепторов в высокочувствительном состоянии (D2^{high}) в среднем являлась $18 \pm 1.4\%$ в гомогенате стриатума +/+ мышей, в то время как данный показатель составил $38 \pm 1.2\%$ у 100P/100P мышей ($p < 0.001$).

5.5. Эффекты галоперидола (0.8 мг/кг) на гиперактивность, вызванной амфетамином

Для оценки вклада D2 рецепторов в гиперактивность, вызванной амфетамином, был проведен данный фармакологический эксперимент. MANOVA обнаружила достоверный эффект генотипа [$F(1,61) = 25.7; p < 0.01$], фармакологических препаратов [$F(3, 61) = 56.1; p < 0.001$], временного интервала [$F(11, 671) = 12.6; p < 0.001$], взаимодействий препарат \times временной интервал [$F(33,671) = 5.8; p < 0.01$] и генотип \times препарат \times временной интервал [$F(33, 671) = 14.7; p < 0.01$] на двигательную активность. Введение амфетамина (0.5 мг/кг) вызывало гиперактивность у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 21А-Б), не оказывая действия на мышей дикого типа. Галоперидол эффективно блокировал эффекты амфетамина, нормализуя двигательную активность 100P/100P мышей.

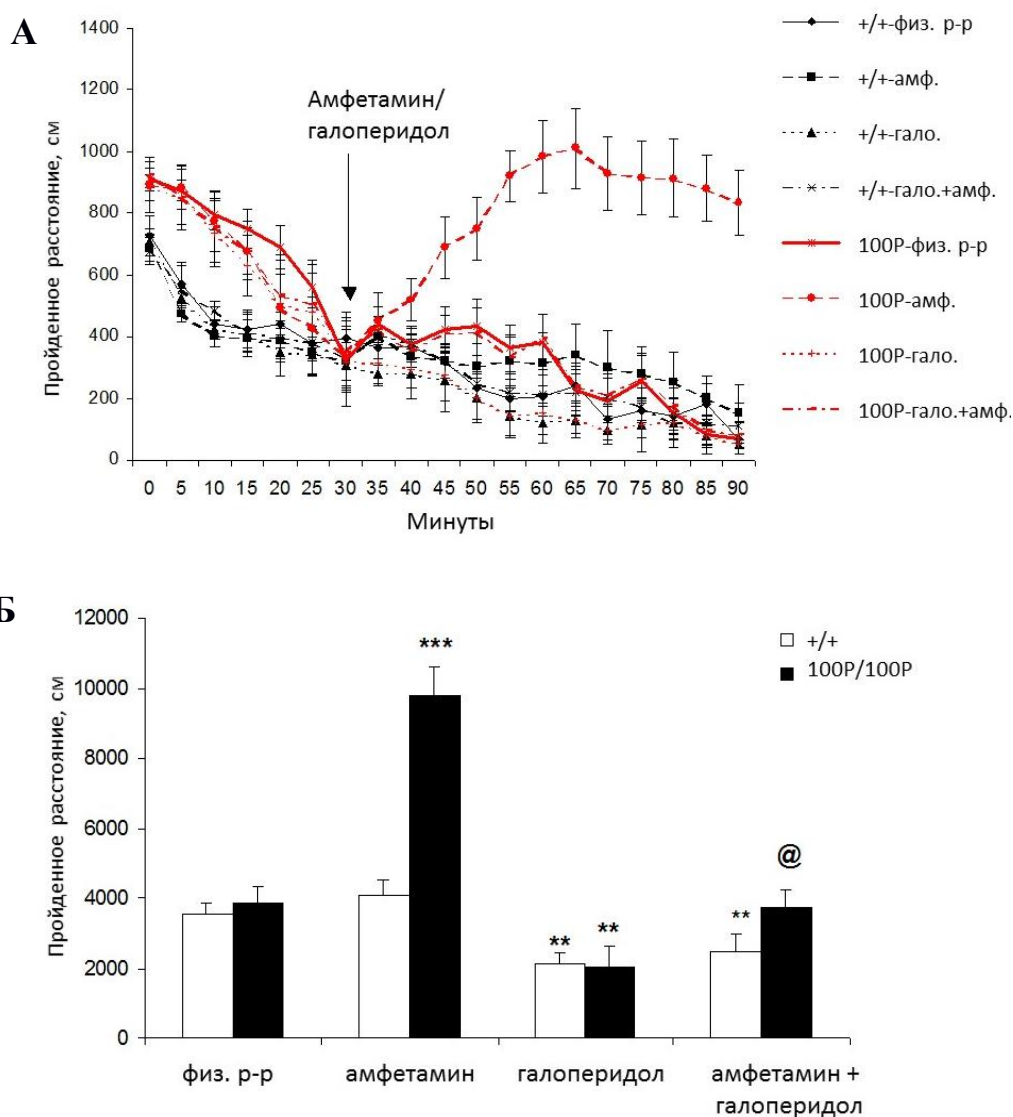


Рис. 21А-Б. Галоперидол (0.8 мг/кг) блокировал гиперактивность у мышей DISC1-L100P (100P/100P), вызванную амфетамином (0.5 мг/кг) ($n = 7-10$). А. Эффекты совместного введения амфетамина и галоперидола на пройденное расстояние в тесте «открытое поле» у 100P/100P мутантов и мышей дикого типа (+/+). Б. Суммарное пройденное расстояние, оцененное после 30-минутного адаптационного периода. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с физ. раствором внутри каждого генотипа; @ - $p < 0.01$ – по сравнению с 100P/100P мышами на фоне введения амфетамина.

5.6. Взаимодействия DISC1-L100P протеина с PDE4B, GSK-3 и D2 рецепторами

N-конец DISC1 протеина важный участок для взаимодействия с PDE4B на участке между 220-283 а.к. DISC1 белка при формировании комплекса DISC1 x PDE4B (Millar et al., 2005). Более детальное исследование DISC1 x PDE4B межбелковых взаимодействий подтвердил сайт взаимодействий с DISC1 - 190-230 а.к., а также идентифицировал новые места взаимодействий 31-65 а.к., 101-135 а.к. и 266-290 а.к. и 611-650 а.к. на DISC1 протеине (Murdoch et al., 2007). Следовательно, точечная мутация в позиции 100 а.к. потенциально может нарушать межбелковые взаимодействия с PDE4B. Действительно, при экзогенной коэкспрессии DISC1 и PDE4B в клетках HEK293 было обнаружено, что DISC1-L100P мутация достоверно снижает связывание с PDE4B (Рис. 22А-Б).

N-конец DISC1 белка связывается с UCR2 доменом PDE4B в цАМФ-зависимой манере (Millar et al., 2005). Именно, DISC1 связывает нефосфорилированный фермент PDE4B с пониженной активностью, который высвобождается в ответ на повышение уровня цАМФ и фосфорилируется с помощью PKA. Следовательно, DISC1 x PDE4B межбелковые взаимодействия модулируются внутриклеточным уровнем цАМФ. Оценка ферментативной активности PDE4B в лизатах головного мозга экспериментальных мышей не выявила изменений у 100P/100P линии (Рис. 22А-Б), не смотря на ослабленные DISC1 x PDE4B межбелковые взаимодействия.

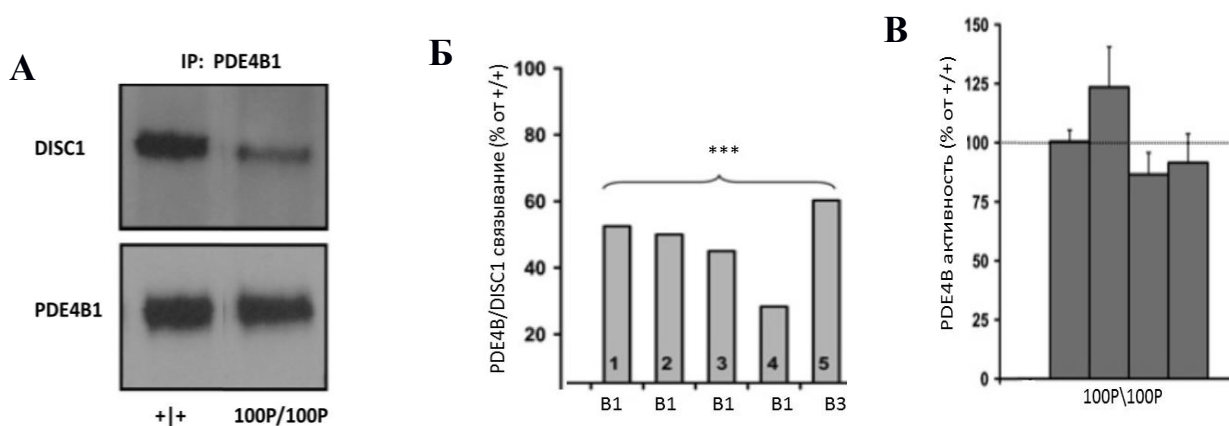


Рис. 22А-В. Ослабленное взаимодействие между DISC1-L100P и PDE4B. **А.** Вестерн блоттинг PDE4B1 иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и PDE4B (нижняя панель) антителами. Полоса DISC1 блота соответствуют 100 кДа и полоса PDE4B - 80 кДа. **Б.** Ассоциация между экзогенно экспрессирующимися PDE4B изоформами и мутантным DISC1 белком. Была проведена пятикратная оценка межбелковых связываний, используя антитела к PDE4B1 (B1) и PDE4B3 (B3). Числа в каждом столбике обозначают число независимых экспериментов. Связывание PDE4B изоформ к DISC1-L100P мутантной форме протеина достоверно снижена (p 's < 0.001) по отношению к контрольному DISC1^{+/+}. **В.** Ферментативная активность PDE4B достоверно не отличалась между 100P/100P и +/+ в лизатах головного мозга мышей ($n = 4$ и $n = 4$, соответственно). Активность представлена в виде среднего трёх независимых экспериментов. *** - $p < 0.001$ – по сравнению с мышами дикого типа (+/+).

Поскольку N-конец DISC1 протеина (участок между 1 и 220 а.к.) также напрямую взаимодействует с GSK-3 β , подавляя ее активность и нарушая регуляцию Wnt/ β -катенинового пути и пролиферацию нейрональных предшественников (Mao et al., 2009), на следующем этапе представлялось актуальным оценить эффект DISC1-L100P мутации на взаимодействие с GSK-3. Применяв метод коиммуноперципитации, было обнаружено, что DISC1-L100P достоверно слабее взаимодействует с GSK-3 α и GSK-3 β в лизатах стриатума (p 's < 0.05), снижая связывание с GSK-3 α,β на ~ 30% и 40%, соответственно (Рис. 23А-В). Реципрокный анализ межбелковых взаимодействий выявил, что обе изоформы GSK-3 α,β также достоверно слабее взаимодействуют с DISC1-L100P (p 's < 0.05), снижая связывание с DISC1-L100P на ~ 50% в обоих случаях (Рис. 23Г-Ж).

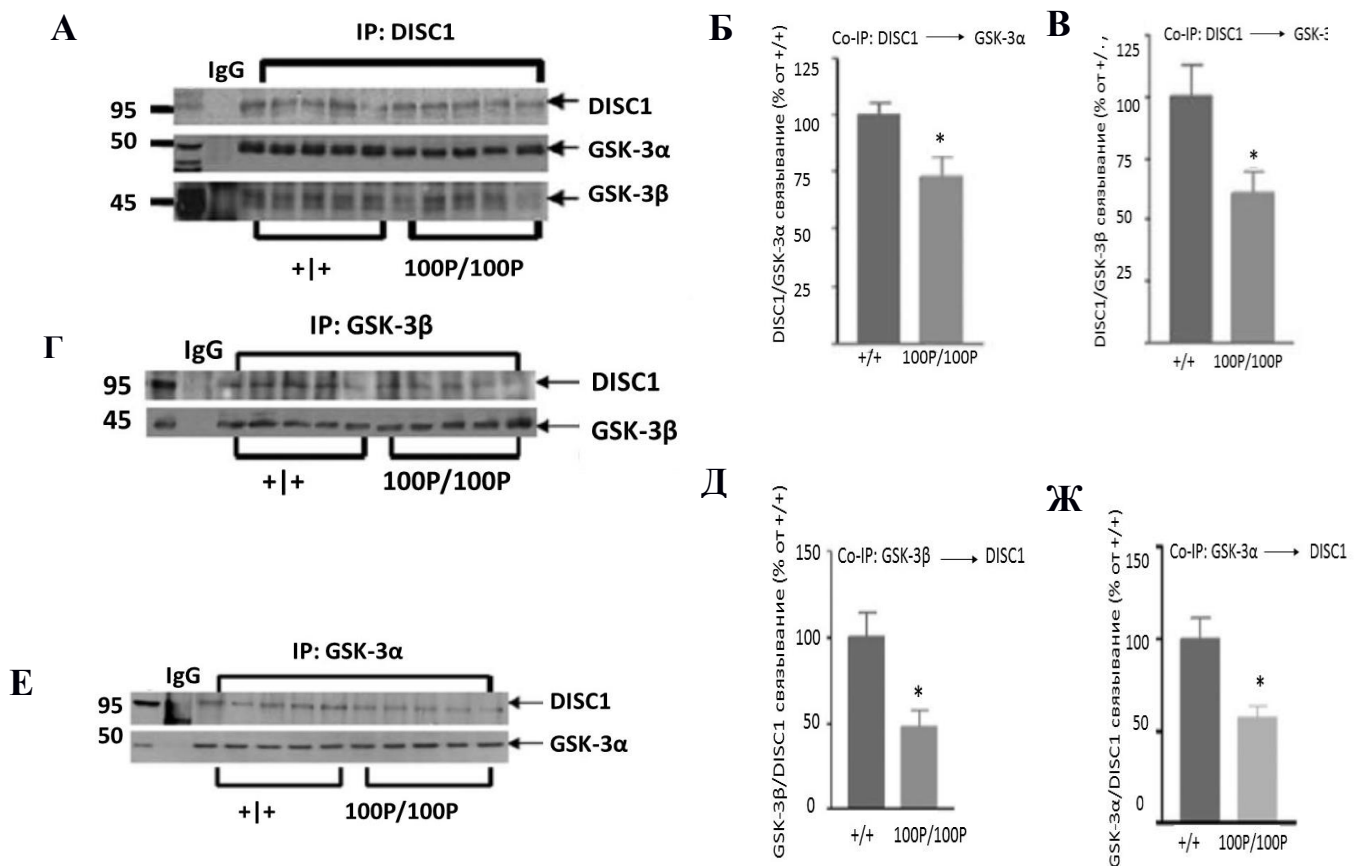


Рис. 23А-Ж. Ослабленное межбелковое взаимодействие DISC1-L100P с GSK-3 α и GSK-3 β в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+; n = 5) и DISC1-L100P (100P/100P; n = 5). **А.** Вестерн блоттинг DISC1 иммуноперципитации с DISC1 (верхняя панель) и GSK-3 α и GSK-3 β (нижняя панель) антителами. Полоса DISC1 блота соответствуют 95 кДа, полоса GSK-3 α - 50 кДа, GSK-3 β - 45 кДа. **Б-В.** Денситометрический анализ коиммуноперципитации DISC1 с GSK-3 α (**Б**) и GSK-3 β (**В**). Связывание DISC1-L100P с GSK-3 изоформами достоверно снижено (p 's < 0.05) по сравнению с +/+ мышами. **Г.** Вестерн блоттинг GSK-3 β иммуноперципитации с DISC1 (верхняя панель) и GSK-3 β (нижняя панель) антителами. **Д.** Денситометрический анализ коиммуноперципитации GSK-3 β с DISC1. **Е.** Вестерн блоттинг GSK-3 α иммуноперципитации с DISC1 (верхняя панель) и GSK-3 α (нижняя панель) антителами. **Ж.** Денситометрический анализ коиммуноперципитации GSK-3 α с DISC1. * - p < 0.05 – по сравнению с +/+ мышами.

Для оценки ферментативной активности GSK-3 оценивали уровень фосфорилирования GSK-3 α и GSK-3 β также в лизатах стриатума экспериментальных животных. Оказалось, что количество фосфорилированной формы GSK-3 α в позиции серин-21 достоверно снижено у 100P/100P мутантов по сравнению с мышами дикого типа ($p < 0.01$; Рис. 24А-Б), в то время как фосфорилирование GSK-3 β достоверно не отличалось между генотипами. Также не было найдено межгенетических отличий по уровню общей экспрессии GSK-3 α/β (Рис. 24А-Б).

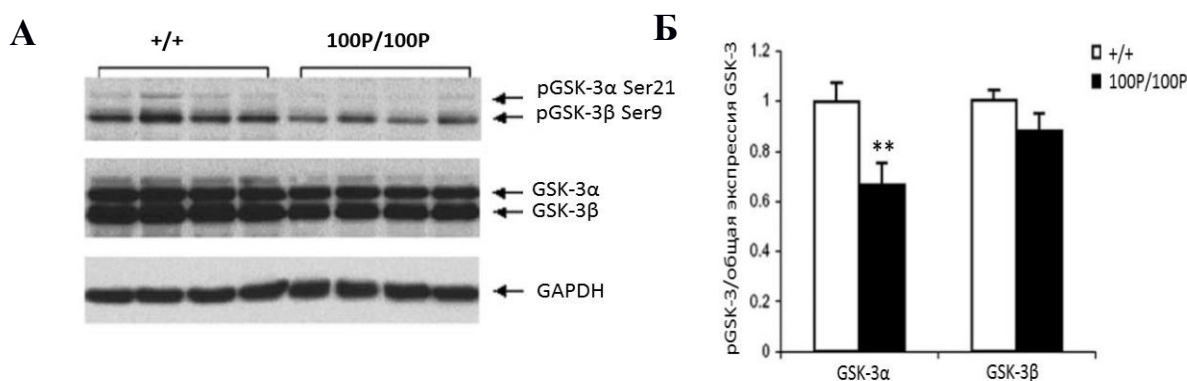


Рис. 24А-Б. Функциональная активность GSK-3 в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+; $n = 7$) и 100P/100P ($n = 15$). А. Репрезентативный вестерн блоттинг иммуноперципитации с антителами к pGSK-3 α/β по Серину-21/9, общей экспрессии GSK-3 α/β протеина, а также GAPDH в качестве контроля загрузки образцов. Б. Денситометрический анализ иммуноперципитации с используемыми антителами. ** - $p < 0.01$ – по сравнению с +/+ мышами.

Учитывая, выявленные нарушения DISC1 x GSK-3 межбелковых взаимодействий, вызванных DISC1-L100P точечной мутацией на фоне проявления шизофреноподобного поведения у мышей линии 100P/100P и их чувствительности к антипсихотикам, а также тот факт, что активация D2 рецепторов стимулирует GSK-3 внутриклеточный сигнальный путь, и что D2 рецепторы являются основной терапевтической мишенью антипсихотиков, следующим этапом исследования была оценка межбелкового связывания между DISC1 и D2 рецепторами. Коиммуноперципционный анализ выявил достоверное усиление взаимодействий между D2 рецепторами и DISC1 (Рис. 25А-Б; $p < 0.01$) без изменений уровня экспрессии D2 рецепторов у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 25В).

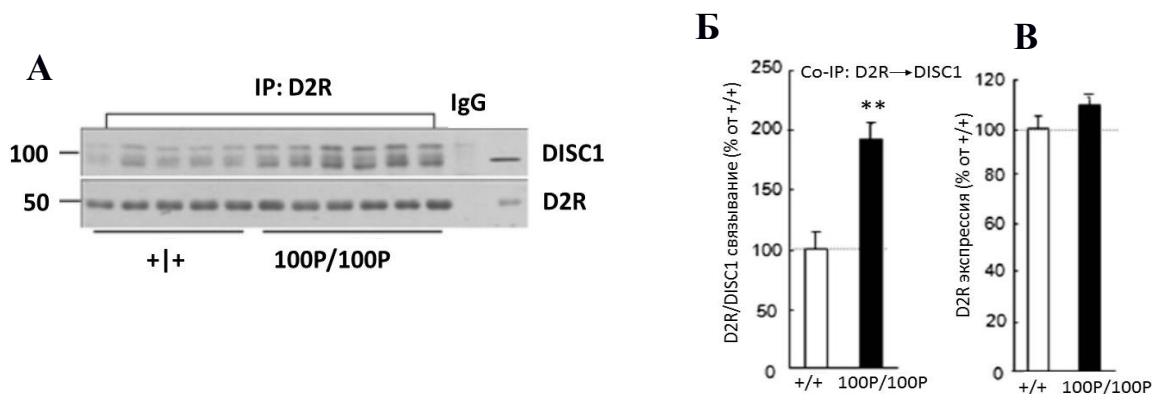


Рис. 25А-Б. Усиление межбелковых взаимодействий между DISC1-L100P и D2 рецепторами в лизатах стриатума мышей дикого типа (+/+; n = 5) и DISC1-L100P (100P/100P; n = 6). **А.** Вестерн блоттинг D2 рецепторов иммуноперцепитации с DISC1 (верхняя панель) и D2 рецепторами (нижняя панель) антителами. Полоса DISC1 блота соответствуют 100 кДа, полоса D2R - 50 кДа. **Б-В.** Денситометрический анализ коиммуноперсипитации D2 рецепторов с DISC1 (**Б**) и уровня экспрессии D2 рецепторов (**В**). ** - $p < 0.01$ – по сравнению с +/+ мышами.

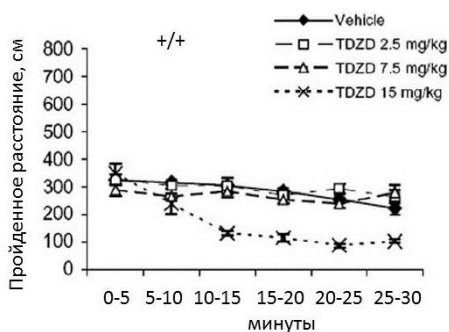
5.7. Эффекты фармакологического и генетического ингибирования GSK-3 на дефицит престаимульного торможения у 100P/100P линии мышей.

Принимая во внимание повышенную ферментативную активность GSK-3 (Рис. 24А-Б) у мышей линии 100P/100P, представлялось актуальным оценить эффективность блокатора GSK-3 в коррекции шизофреноподобного поведения у мышей данной линии. Для достижения данной цели использовали фармакологический ингибитор GSK-3 – TDZD-8, а также нокаутных мышей по гену GSK-3 α .

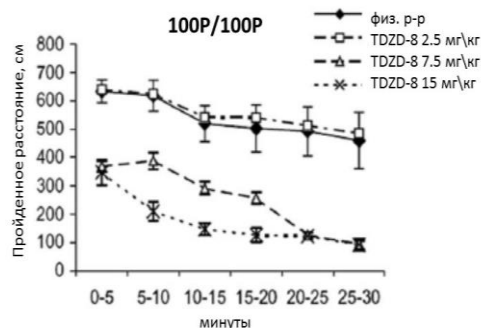
Сперва были оценены эффекты TDZD-8 в трех дозах на двигательную активность экспериментальных мышей (2.5 мг\кг; 7.5 мг\кг и 15мг\кг). MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [F (1,50) = 17.6; $p < 0.001$], препарата [F (3,50) = 21.9; $p < 0.001$], временного интервала [F (5,250) = 35.7; $p < 0.001$], и взаимодействий между данными факторами – генотип x препарат [F (3,50) = 11.5; $p < 0.01$], генотип x временной интервал [F (15,250) = 2.7; $p < 0.05$], препарат x временной интервал [F (15,250) = 5.9; $p < 0.001$] и генотип x препарат x временной интервал [F (15,250) = 2.21; $p < 0.01$]. 100P/100P мутантные мыши на фоне физиологического раствора проявляли гиперактивность по отношению к мышам дикого типа (p 's < 0.001 в интервале от 0 до 10 минут и p 's < 0.05 в интервале от 10 до 25 минут) (Рис. 26А-Б). TDZD-8 оказывал дозо-зависимый эффект на мышей обоих генотипов. Препарат не влиял на двигательную активность в низкой дозе, и эффективно нормализовал гиперактивность у 100P/100P мышей в дозе 7.5 мг\кг, не влияя

на поведение мышей дикого типа. Однако, в высокой дозе (15 мг\кг) TDZD-8 оказывал седативное действие на экспериментальных животных двух генотипов (Рис. 26А-Б).

А



Б



В

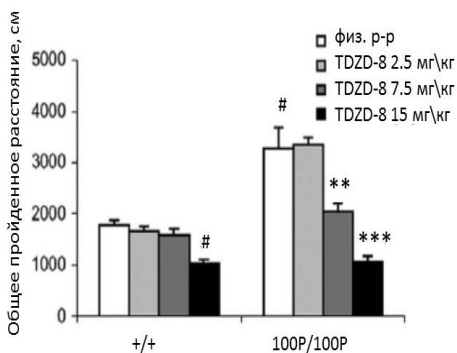


Рис. 26А-В. Эффекты TDZD-8 (2.5мг/кг, 7.5 мг/кг и 15 мг/кг) на двигательную активность (А) мышей дикого типа (+/+; n = 6-8) и (Б) 100P/100P мутантных мышей (n = 6-9) в течение 30 минут. В. Общее пройденное расстояние у мышей всех экспериментальных групп за 30 минут. # - p < 0.001 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. раствора; ** - p < 0.01; *** - p < 0.001 – по сравнению с 100P/100P мышами на фоне введения физ. р-ра.

Затем оценивалось корректирующее влияние TDZD-8 на дефицит сенсорномоторной фильтрации и латентного торможения у 100P/100P мутантов (Рис. 27). Введение TDZD-8 в дозе 7.5 мг/кг скорректировало нарушения когнитивных функций у экспериментальных животных. Так, MANOVA выявил достоверное влияние престимулов [F (2,90) = 33.2; p < 0.01], генотипа [F (1, 45) = 64.2; p < 0.001], препарата [F (2,45) = 41.5; p < 0.001], а также взаимодействий генотип x препарат [F (1,45) = 31.8; p < 0.001] на пре-стимульное торможение. TDZD-8 достоверно корректировал дефицит пре-стимульного торможения у 100P/100P мышей (Рис. 27А), не оказывая действия на акустическую реакцию вздрагивания (Рис. 27Б).

TDZD-8 также оказывал корректирующее действие на 100P/100P мутантных мышей в тесте «Латентное торможение». Животные восьми экспериментальных групп не отличались между собой по питьевому поведению (средняя продолжительность выполнения 25 лизков = 8.4 сек; p's > 0.05). MANOVA выявил достоверное влияние «пре-экспозиции» [F (1,60) = 260.2; p < 0.001], генотипа [F (1,60) = 57.4; p < 0.001],

взаимодействий генотипа x препарата [$F(1,60) = 48.2; p < 0.001$] и «пре-экспозиция» x препарат [$F(1,60) = 11.9; p \leq 0.01$]. 100P/100P мыши продемонстрировали нарушение латентного торможения на фоне введения физиологического раствора ($p > 0.05$) (Рис. 27В), в то время как мутантные мыши на фоне действия TDZD-8 проявили латентное торможение памяти страха ($p < 0.001$) подобно мышам дикого типа (p 's < 0.001).

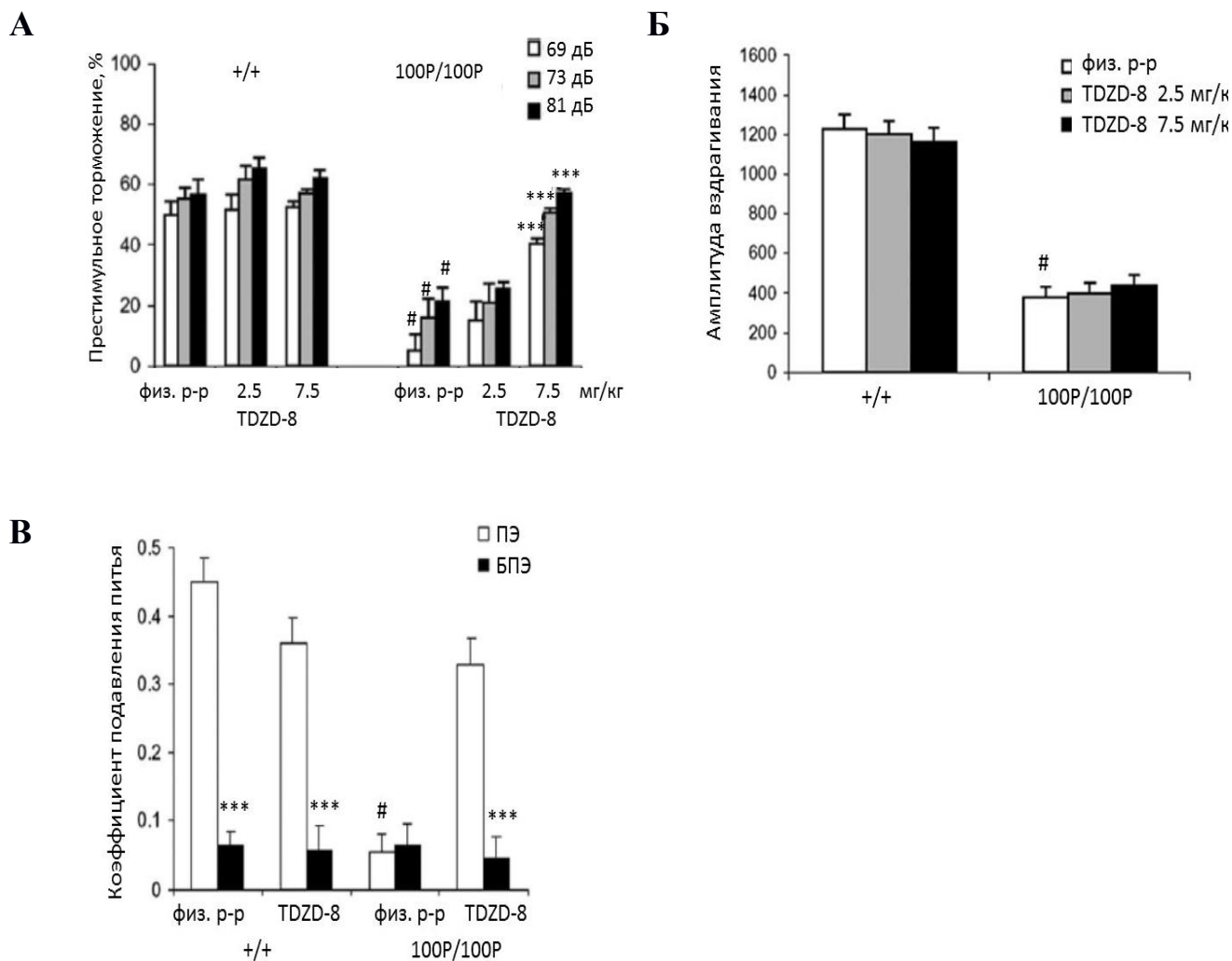


Рис. 27А-В. Эффекты TDZD-8 (2.5мг/кг, 7.5 мг/кг) на шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей в тестах «Престимульное торможение реакции вздрагивания» ($N = 7-12$ мышей) и «Латентное торможение» ($N = 8-9$ мышей). **А.** TDZD-8 в дозе 7.5 мг/кг корректировал дефицит сенсорно-моторной фильтрации у 100P/100P мышей, не влияя на амплитуду реакции вздрагивания (**Б**). **В.** Блокатор GSK-3 также достоверно повышал коэффициент подавления питья у группы 100P/100P мутантов с пре-экспозицией к тону (ПЭ). # - $p < 0.001$ – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. раствора; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с 100P/100P мышами на фоне введения физ. р-ра (**А**) или по сравнению с ПЭ внутри каждой экспериментальной группы (**В**).

Параллельно с фармакологическим ингибированием активности GSK-3, также оценивался эффект генетической инактивации GSK-3 α на 50% у мышей, несущих аллели дикого (+/+) или мутантного (100P/100P) типа при создании двойных мутантов (100P/100P x GSK3 α -гетерозиготы). MANOVA выявил достоверное влияние престимулов [F (2,134) = 24.2; p < 0.001] и генотипа [F (5,67) = 27.5; p < 0.001] на престимульное торможение реакции вздрагивания. Дефицит сенсорно-моторной фильтрации у 100P/+ и 100P/100P мышей восстанавливался при генетическом снижении экспрессии GSK-3 α аллеля на 50% (Рис. 28). Также был обнаружен достоверный эффект генотипа [F (5,67) = 19.4; p < 0.001] на амплитуду реакции вздрагивания, но подобно эксперименту с TDZD-8, отсутствие аллеля GSK-3 α на 50% не изменило реакцию вздрагивания у гетерозиготных и гомозиготных 100P мышей (Табл. 3).

Генетическая инактивация GSK-3 α на 50% также оказывала корректирующее действие на дефицит латентного торможения у 100P/100P мутантных мышей. Животные 12 экспериментальных групп не отличались между собой по питьевому поведению (средняя продолжительность выполнения 25 «слизваний» = 8.4 сек; p's > 0.05). MANOVA выявил достоверное влияние «пре-экспозиции» [F (1,109) = 99.3; p < 0.001], генотипа [F (5,109) = 23.7; p < 0.001], взаимодействий генотипа x «пре-экспозиции» [F (5,109) = 12.9; p < 0.001] на латентное торможение. Гетеро- и гомозиготные 100P мутантные мыши продемонстрировали дефицит латентного торможения (p's > 0.05), в то время как генетическая инактивация одного GSK-3 α аллеля восстанавливала нарушение способности мутантных животных игнорировать нерелевантный стимул (Рис. 29).

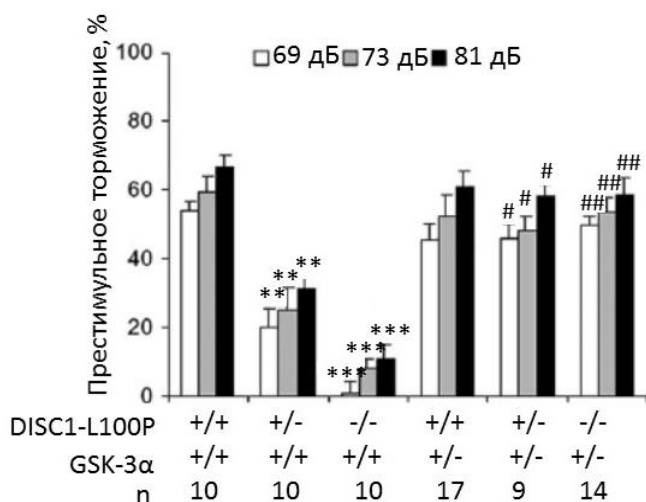


Рис. 28. Эффекты генетической инактивации GSK-3 α на дефицит сенсорно-моторной фильтрации информации у 100P/+ и 100P/100P мышей. Процент престимульного торможения реакции вздрагивания у генетических кроссов между 100P/100P и GSK-3 α гетерозиготными мышами. # - p < 0.01, ## - p < 0.001 – по сравнению с DISC1-L100P мышами; ** - p < 0.01; *** - p < 0.001 – по сравнению с +/+ мышами.

Таблица 3. Эффекты генетической инактивации GSK-3 α на реакцию вздрагивания мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей.

DISC1	GSK-3 α	Амплитуда вздрагивания
+/+	+/+	1108.3 \pm 121.3 (n = 10)
100P/+	+/+	389.6 \pm 85.2 (n = 10) *
100P/100P	+/+	401.3 \pm 99.5 (n = 10) *
+/+	GSK-3 α /-	1210.4 \pm 112.5 (n = 17)
100P/+	GSK-3 α /-	405.3 \pm 87.3 (n = 9) *
100P/100P	GSK-3 α /-	393.7 \pm 65.2 (n = 14) *

*p < 0.001 – по сравнению с мышами дикого типа (+/+)

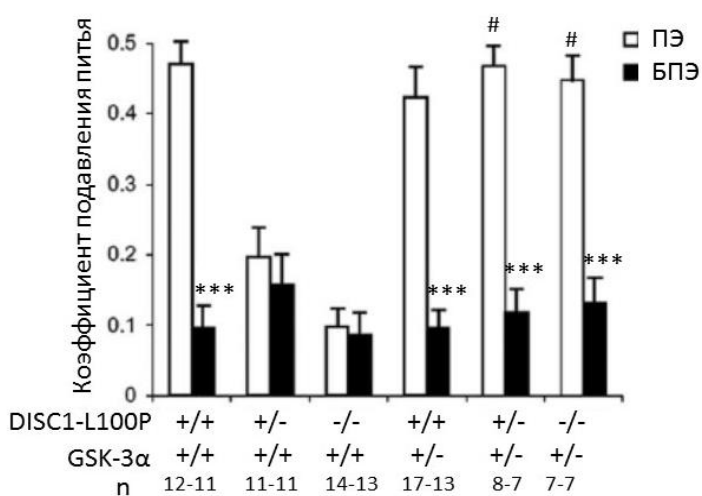
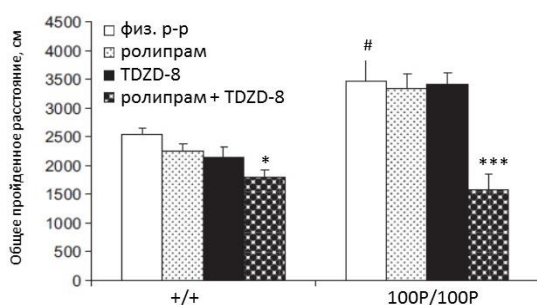


Рис. 29. Эффекты генетической инактивации GSK-3 α на дефицит латентного торможения памяти страха у DISC1-L100P гетеро- и гомозиготных мышей. Коэффициент подавления питья у экспериментальных групп с пре-экспозицией (ПЭ) и без пре-экспозиции (БПЭ) к тону у генетических кроссов между DISC1-L100P-гомозиготными и GSK-3 α -гетерозиготными мышами. # - p < 0.001 – по сравнению с DISC1-L100P гетеро- или гомозиготными мышами; *** - p < 0.001 – по сравнению с ПЭ группой внутри каждого генотипа.

Учитывая то, что ролипрам (блокатор PDE4B) (Рис. 13), а также TDZD-8 (блокатор GSK-3) корректировали шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей, а также тот факт, что DISC1-L100P мутация нарушала межбелковых взаимодействий с PDE4B и GSK-3, представлялось актуальным оценить синергистический эффект между ролипрамом и TDZD-8, блокирующих оба фермента одновременно в подпороговой дозе. Следовательно, в данном эксперименте оценивали эффективность ролипарма (0.1 мг/кг) и TDZD-8 (2.5 мг/кг) на гиперактивность и дефицит престаимульного торможения у 100P/100P мышей.

MANOVA обнаружил достоверное влияние генотипа [$F(1,48) = 20.1; p < 0.001$], препарата [$F(3,48) = 11.2; p < 0.001$] и их взаимодействий [$F(3,48) = 3.5; p < 0.05$] на двигательную активность у мышей дикого типа и 100P/100P мутантов. 100P/100P мыши на фоне введения физиологического раствора проявляли гиперактивность ($p < 0.001$) по сравнению с контролем (Рис. 30А). Ролипрам и TDZD-8 не оказывали действия на локомоцию у мышей двух генотипов, но эффективно снижали гиперактивность у 100P/100P мышей ($p < 0.001$) при совместном введении. MANOVA выявил достоверное влияние генотипа [$F(1,51) = 186.2; p < 0.001$], препарата [$F(3,51) = 25.2; p < 0.001$], пре-стимула [$F(2,102) = 125.8; p < 0.001$], генотип \times препарат [$F(3,51) = 15.1; p < 0.01$] на престаимпульное торможение. Дефицит сенсорно-моторной фильтрации наблюдался у 100P/100P мутантных мышей на фоне введения физиологического раствора (p 's < 0.001) (Рис. 30Б). Ролипрам и TDZD-8 не оказывали действия на дефицит престаимпульного торможения у мышей двух генотипов (p 's > 0.05). Совместное введение ролипрама и TDZD-8 в данных дозах (0.1 мг/кг и 2.5 мг/кг, соответственно) эффективно восстановило дефицит пре-стимульного торможения до контрольного уровня (p 's < 0.001), а также улучшило сенсорно-моторную фильтрацию у мышей дикого типа в ответ на 69 дБ и 81 дБ ($p < 0.05$ и $p < 0.01$, соответственно). MANOVA обнаружил достоверный эффект генотипа [$F(1,51) = 198.3; p < 0.001$] на амплитуду вздрагивания, но не препарата и генотип \times препарат взаимодействий (p 's > 0.05). 100P/100P мыши проявляли пониженную амплитуду вздрагивания по сравнению с мышами дикого типа (Табл. 4).

А



Б

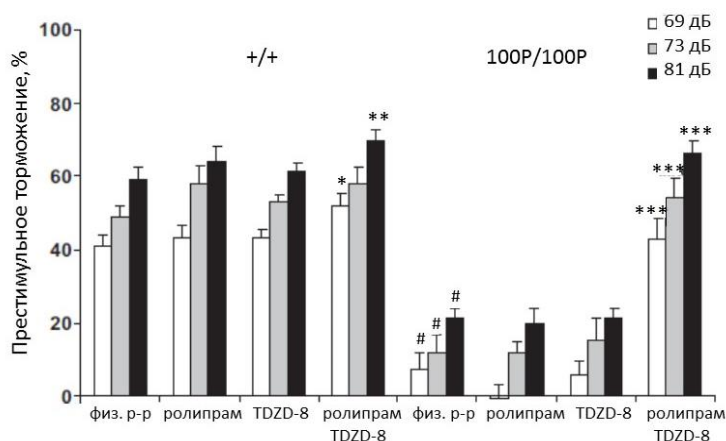


Рис. 30А-Б. Синергистический эффект между ролипармом (0.1 мг/кг) и TDZD-8 (2.5 мг/кг) на двигательную активность в течение 30 минут (А) и престаимпульное торможение (Б) у 100P/100P мутантов (n = 7-8) и мышей дикого типа (+/+; n = 6-9). # - p < 0.001 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физиологического раствора; * - p < 0.05; ** - p < 0.01; *** - p < 0.001 – по сравнению с физ. раствором внутри каждого генотипа.

Таблица 4. Эффекты ролипрама и TDZD-8 на амплитуду вздрагивания мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей.

Препарат\Генотип	+/+	100P/100P
Физ. раствор	1142 ± 125.3	419.7 ± 58.1 #
Ролипрам	1270.1 ± 96.8	364.4 ± 64.4
TDZD-8	1180.2 ± 89.3	447.7 ± 71.4
Ролипрам + TDZD-8	1204.5 ± 94.3	498.8 ± 109.3

p < 0.001 – по сравнению с мышами дикого типа

5.8. Эффекты коррекции усиленных взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами с помощью TAT-D2R пептида на шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей.

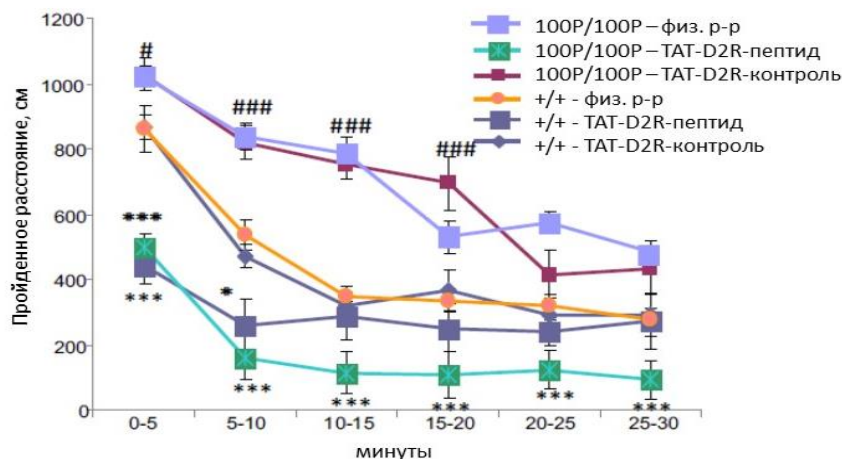
На основе выявленного усиления взаимодействий между DISC1-L100P и D2 рецепторами в дальнейшем рядом биохимических экспериментов было картировано место взаимодействия D2 рецептора с DISC1 протеином (район третьей внутриклеточной петли D2R [K211-T225]). В свою очередь, N-конец DISC1, но не C-конец, участвует в межбелковых взаимодействиях с D2 рецепторами (Su et al., 2014). Следовательно, был синтезирован пептид, разрывающий взаимодействия между DISC1 и D2 рецепторами (TAT-D2R) для коррекции формирования межбелкового комплекса DISC1 x D2 рецепторы и GSK-3 активности, что как следствие, возможно, будет оказывать антипсихотическое действие на 100P/100P мышей. Для проверки данного предположения оценивали поведенческие эффекты TAT-D2R пептида (3 нмоль/г), введенного внутривентриально за 30 минут до тестирования.

MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [F (1,49) = 6.35; p < 0.05], пептида [F (1,49) = 18.9; p < 0.001], временного интервала [F (5, 245) = 63.1; p < 0.001] и их взаимодействий (p's < 0.05-0.001) на двигательную активность. 100P/100P мыши на фоне введения контрольных соединений проявили гиперактивность по сравнению с мышами дикого типа (Рис. 31А), однако введение TAT-D2R пептида корректировало их гиперактивность, не оказывая седативного действия на мышей дикого типа.

Аналогичное действие TAT-D2R пептида наблюдалось на дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мутантных мышей. MANOVA обнаружил существенное влияние генотипа [F (1,42) = 21.9; p < 0.001], пептида [F (1,42) = 40.3; p < 0.001], пре-стимулов [F (3,126) = 24.6; p < 0.001] и генотип x пептид взаимодействий [F (2,42) = 22.3; p < 0.001] на

престимульное торможение реакции вздрагивания. 100P/100P мутанты продемонстрировали дефицит пре-стимульного торможения при введении физиологического раствора и контрольного соединения, но введение TAT-D2R пептида нормализовало их дефицит сенсорно-моторной фильтрации (Рис. 31Б), не оказывая действия на амплитуду вздрагивания мышей (Табл. 5).

А



Б

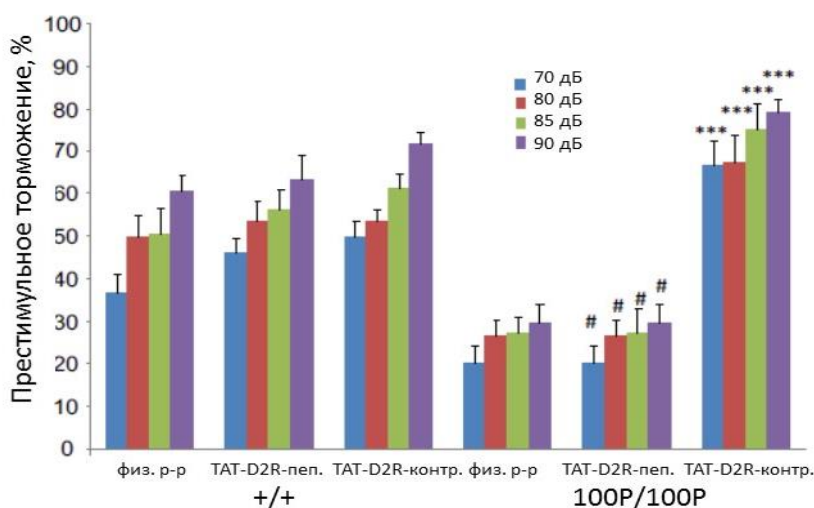


Рис. 31А-Б. Эффект TAT-D2R-пептида на пройденное расстояние за 30 минут (А), а также на престимульное торможение (Б) реакции вздрагивания у мышей дикого типа (+/+; n = 8-8 и n = 8-8) и 100P/100P (n = 9-16 и n = 8-8). # - p < 0.05; # - p < 0.001 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физиологического раствора и TAT-D2R-контрольного соединения; * - p < 0.05; ** - p < 0.01; *** - p < 0.001 – по сравнению с физиологическим раствором и TAT-D2R-контрольным соединением внутри каждого генотипа.

Таблица 5. Эффект TAT-D2R-пептида на амплитуду вздрагивания мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей.

Генотип	Препарат	Амплитуда вздрагивания
+/+	Физ. р-р	665.5 ± 59.8
+/+	TAT-D2R-контроль	583.3 ± 52.3
+/+	TAT-D2R-пептид	587.2 ± 36.2
100P/100P	Физ. р-р	372.5 ± 33.1
100P/100P	TAT-D2R-контроль	408.4 ± 33.6
100P/100P	TAT-D2R-пептид	4473.3 ± 35.1

Заключение к Главе 5

Таким образом, исследование биохимических особенностей головного мозга 100P/100P мутантных мышей идентифицировало повышенную функциональность дофаминергической системы, вызванной, во-первых, нарушением взаимодействий между DISC1-L100P с D2 рецепторами, а также PDE4B и GSK-3, что в свою очередь также повышало ферментативную активность GSK-3. Во-вторых, обнаружено повышенное количество D2 рецепторов в высокочувствительном состоянии в стриатуме 100P/100P мутантов, отражающее, по-видимому, последствия нарушения работы DISC1 интерактома, и являющейся причиной повышенной фармакологической чувствительности к амфетамину у мышей данной генетической линии. Примечательно, что существенных изменений уровня дофамина и его метаболитов как на базовом уровне, так и под воздействием психостимулянта, не выявлено. В-третьих, обнаружено, что блокаторы PDE4B и GSK-3, а также TAT-D2R-пептид оказывают антипсихотические эффекты, корректируя шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей. Показан синергистический эффект *in vivo* между блокаторами PDE4B и GSK-3 на 100P/100P мутантах, демонстрируя их совместную внутриклеточную функциональность в ассоциации с DISC1.

Глава 6. ПАТОГЕННОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ШИЗОФРЕНОПОДОБНОМУ ПОВЕДЕНИЮ (100P/+) И МАТЕРИНСКОЙ ИММУННОЙ АКТИВАЦИЕЙ (МИА): ГИБРИДНАЯ (ГЕН X СРЕДА) МОДЕЛЬ ШИЗОФРЕНИИ

Шизофрения является болезнью нейроразвития, где DISC1 и его интерактом выполняют важную роль, оказывая влияние на пролиферацию клеток-предшественников, их миграцию, и дифференцировку (Chubb et al., 2008; Brandon and Sawa, 2011). Следовательно, было предположено, что поскольку 100P/100P мутация оказывает патогенное воздействие и вызывает шизофреноподобное поведение у мышей, то воздействие материнской иммунной активации (МИА) в эмбриогенезе на мышей с

предрасположенностью к шизофрении, т.е. на 100P⁺ гетерозиготных мышей, нарушит нейроразвитие и спровоцирует шизофреноподобное поведение у гибридов 100P⁺ x МИА.

На первом этапе данного исследования оценивали эффект МИА, вызванной PolyI:C в дозе 5 мг/кг согласно литературе (Meuer et al., 2005) на поведение +/+, 100P⁺ и 31L⁺ мышей. MANOVA выявил достоверный эффект МИА [$F(1,24) = 36$; $p < 0.001$], генотипа [$F(2,24) = 21$; $p < 0.001$] и их взаимодействий [$F(2,24) = 21$; $p < 0.001$] на число помётов, а также на число потомков: эффект МИА [$F(1,24) = 27.9$; $p < 0.001$], генотипа [$F(2,24) = 19.9$; $p < 0.001$], эффект генотип x МИА взаимодействий [$F(2, 24) = 19.7$; $p < 0.001$]. Самки 100P⁺ под воздействием МИА в дозе 5 мг/кг не имели потомства, хотя данные показатели не отличались у остальных экспериментальных групп, включая 31L⁺ линию. Следовательно, в последующих экспериментах использовали PolyI:C в дозе 2.5 мг/кг.

6.1. Проявление шизофреноподобного поведения у 100P⁺ x МИА мышей

Эффекты взаимодействия МИА с 100P мутацией оценивались в таких тестах как «открытое поле», социальная мотивация и распознавание, престаимпульное торможение, распознавание смещенного и нового объектов и латентное торможение.

«Открытое поле»: MANOVA выявил эффект временных интервалов [$F(5,255) = 19.7$; $p < 0.001$] на горизонтальную активность, Мыши всех экспериментальных групп не отличались между собой по двигательной активности (Рис. 32А-Б), постепенно снижая уровень активности. Однако, MANOVA идентифицировал значительное влияние МИА [$F(1,39) = 8.3$; $p < 0.01$] и МИА x временной интервал взаимодействий [$F(5,195) = 2.5$; $p < 0.05$] на вертикальную активность. Мыши двух генотипов под влиянием МИА достоверно снижали число пересечённых вертикальных инфракрасных лучей по сравнению с соответствующими контрольными группами (Рис. 32А-Б).

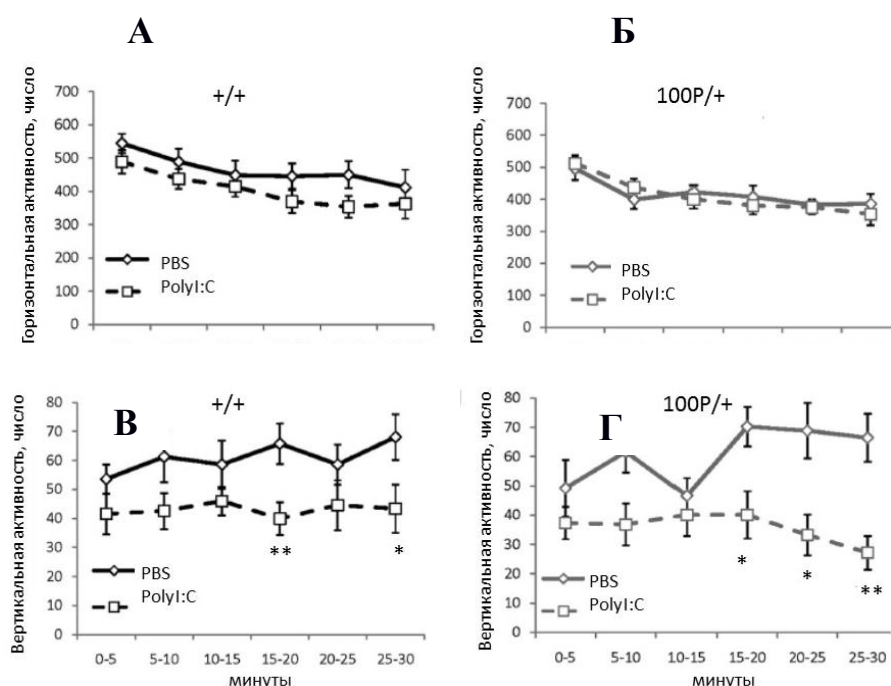


Рис. 32А-Г. Эффекты МИА, вызванной введением polyI:C (2.5 мг/кг) на горизонтальную (А-Б) и вертикальную (В-Г) активность в тесте «открытое поле» у мышей дикого типа (+/+) и 100P/+ гетерозиготных мышей. N = 8-12; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с PBS-+/+ мышами.

Социальная мотивация и распознавание: MANOVA обнаружил достоверный эффект МИА [$F(1,44) = 8.2$; $p < 0.01$], «партнёра 1» [$F(1,44) = 142.9$; $p < 0.001$], МИА x «партнёр 1» взаимодействий [$F(1,44) = 10.6$; $p < 0.01$] на социальную мотивацию. Мыши двух генотипов под влиянием контрольного растворителя (PBS) демонстрировали интерес к «партнёру 1», проводя дольше времени возле «социального» отсека, чем у нейтрального (Рис. 33А). МИА не оказывала влияния на социальную мотивацию у мышей дикого типа, но нарушала социальное поведение у гетерозиготных 100P/+ животных ($p > 0.05$), которые проводили равное количество времени возле отсеков двух типов. Анализ социального распознавания не выявил эффекта МИА, генотипа и их взаимодействий, однако MANOVA выявила достоверный эффект «партнёра 2» [$F(1,44) = 188.8$; $p < 0.001$]. Действительно, мыши всех экспериментальных групп существенно дольше проводили времени возле отсека с «партнёром 2», чем с уже знакомым «партнёром 1» (Рис. 33Б).

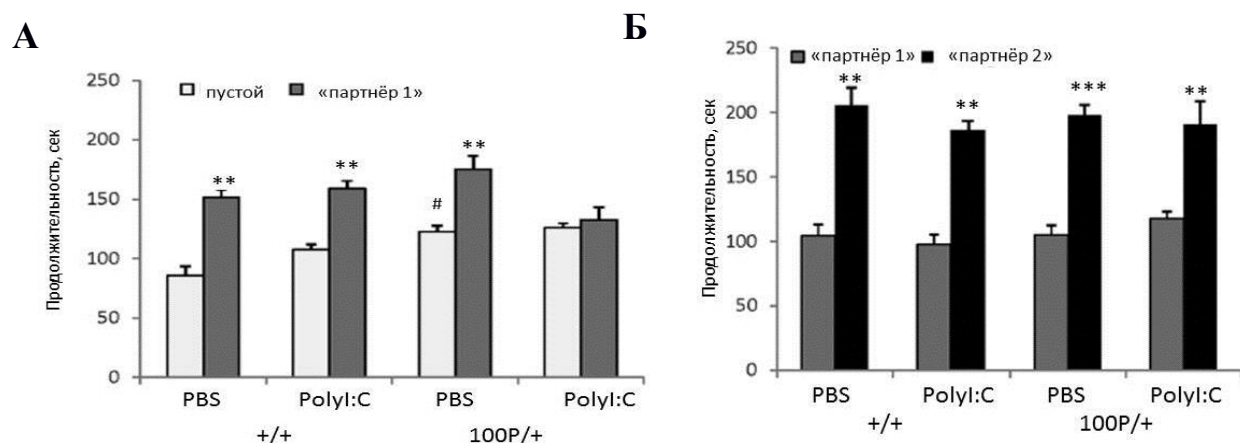


Рис. 33А-Б. Эффекты МИА, вызванной введением polyI:C (2.5 мг/кг) на социальную мотивацию (А) и социальное распознавание (Б) у мышей дикого типа (+/+) и 100P/+ гетерозиготных мышей. N = 8-12; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению со временем, проведенном возле пустого отсека (А) или отсека с «партнёром 1» (Б) внутри каждой группы. # - $p < 0.01$ – по сравнению с PBS-+/+ мышами.

Пре-стимульное торможение: MANOVA обнаружил существенное влияние МИА [$F(1,48) = 5.3$; $p < 0.05$], пре-стимула [$F(2,96) = 86.4$; $p < 0.001$], генотип x МИА [$F(1,48) = 4.7$; $p < 0.05$] и МИА x пре-стимул [$F(2,96) = 5.4$; $p < 0.01$] взаимодействий на пре-стимульное торможение. PolyI:C не влиял на престимульное торможение у мышей дикого типа (Рис. 34А), в то время как вызывал дефицит престимульного торможения у 100P/+

мышей. MANOVA также выявил эффект генотипа [$F(1,48) = 10.7; p < 0.01$] на амплитуду вздрагивания, но не МИА и их взаимодействий (Рис. 34Б).

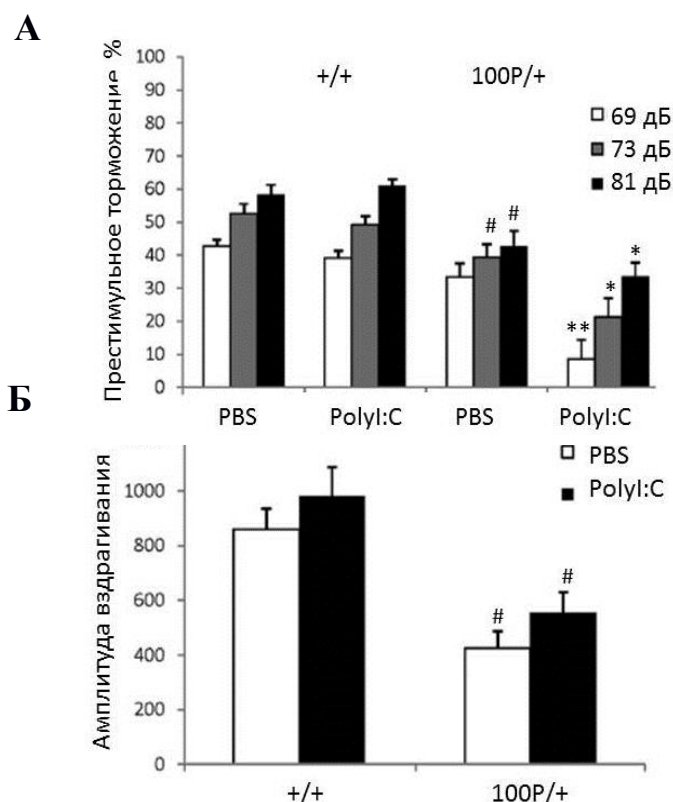


Рис. 34А-Б. Эффекты МИА, вызванной введением polyI:C (2.5 мг/кг) на престимульное торможение (А) и амплитуду вздрагивания (Б) у мышей дикого типа (+/+) и 100P/+ гетерозиготных мышей. N = 7 - 16; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с PBS-100P/+ мышами. # - $p \leq 0.05$ – по сравнению с PBS-+/+ мышами.

Латентное торможение: Мыши всех экспериментальных групп не отличались по периоду А (p 's > 0.05 ; средняя продолжительность периода А = 7.3 сек). MANOVA обнаружила достоверное влияние пре-экспозиции [$F(1,58) = 5.0; p < 0.005$], генотипа [$F(1,58) = 13.8; p < 0.001$] и МИА x генотип взаимодействий [$F(1,58) = 14.2; p < 0.001$] на латентное торможение. PBS-+/+ мыши проявляли латентное торможение ($p < 0.001$), в то время как PBS-100P/+ мыши, а также и PolyI:C-100P/+ мыши продемонстрировали нарушение латентного торможения (p 's > 0.05).

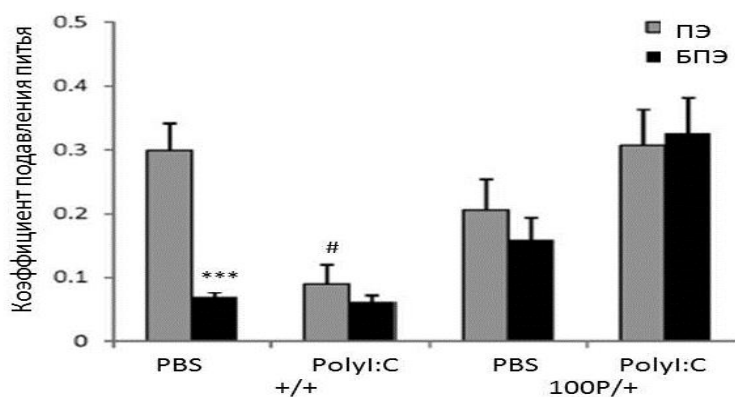


Рис. 35. Эффекты МИА на латентное торможение памяти страха у мышей дикого типа (+/+) и 100P/+ гетерозиготных мышей с «пре-экспозицией» *ПЭ) к тону и «без пре-экспозиции» (БПЭ). N = 7 - 16; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с ПЭ-PBS-+/+ мышами. # - $p < 0.05$ – по сравнению с PBS-+/+ мышами.

6.2. Уровень интерлейкина-6 в головном мозге эмбрионов 100P/+ х МИА мышей

Поскольку одним из ключевых цитокинов, вовлечённых в этиологию шизофреноподобного поведения у мышей, вызванной polyI:C, является интерлейкин-6 (ИЛ-6) (Smith et al., 2007), то на следующем этапе данного исследования оценивали концентрацию ИЛ-6 в головном мозге эмбрионов мышей экспериментальных групп. MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [$F(1, 39) = 113.5$; $p < 0.001$], МИА [$F(2, 39) = 357.0$; $p < 0.001$] и их взаимодействия [$F(2, 39) = 95.5$; $p < 0.001$] на уровень ИЛ-6. Оказалось, что polyI:C повышал уровень ИЛ-6 в дозозависимой манере у мышей всех генотипов. Однако, эмбрионы 100P/+ оказались более чувствительны к МИА в низкой дозе, чем эмбрионы +/+ (p 's < 0.001) (Табл. 6).

Таблица 6. Эффект МИА, вызванной polyI:C в двух дозах на уровень ИЛ-6 в головном мозге эмбрионов мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P мутантных мышей.

Экспериментальная группа	PBS, пг/мкг протеина	PolyI:C-2.5 мг/кг, пг/мкг протеина	PolyI:C-5.0 мг/кг, пг/мкг протеина
+/+	22.5 ± 11.5	86.8 ± 25.4 *	168.6 ± 17.7 ***
100P/+	20.5 ± 6.8	315.7 ± 31.5 ***	923.5 ± 30.6 ***

* $p < 0.05$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с PBS эмбрионами внутри каждого генотипа. N = 8 /на группу

6.3. Превентивный эффект антител к интерлейкину-6 на проявление шизофреноподобных эндофенотипов у 100P/+ х МИА мышей

Повышенный уровень ИЛ-6 у 100P/+ эмбрионов в ответ на МИА предполагает, что, возможно, данный цитокин вовлечен в патогенез шизофреноподобного поведения у гибридов 100P/+ х МИА. Для проверки данного предположения оценивали эффективность антител к ИЛ-6 предотвратить дефицит престаимпульного торможения и латентного торможения у 100P/+ мышей, вызванное МИА.

Престимульное торможение: MANOVA определил существенный эффект престаимулов [$F(2, 78) = 18.4$; $p < 0.001$], генотипа [$F(1, 39) = 15.0$; $p < 0.001$], МИА + антитела к ИЛ-6 [$F(2, 39) = 4.3$; $p < 0.05$] и генотипа х МИА + антитела к ИЛ-6 [$F(2, 39) = 5.5$; $p < 0.01$]. Потомки, рожденные от 100P/+ самок после введения им polyI:C, продемонстрировали дефицит престаимпульного торможения в ответ на три престаимула по сравнению с контрольной группой (p 's < 0.01 при 69 дБ и 73 дБ и $p < 0.05$ при 81 дБ) (Рис. 36А). Совместное введение polyI:C с антителами к ИЛ-6 предотвратило развитие дефицита престаимпульного торможения у 100P/+ мышей (Рис. 36А). MANOVA обнаружил достоверный эффект генотипа [$F(1, 39) = 4.5$; $p < 0.01$] и генотип х МИА взаимодействий [$F(2, 39) = 5.9$; $p < 0.01$] на амплитуду вздрагивания (Рис. 36Б). Введение совместно

PolyI:C с антителами к ИЛ-6 повысило интенсивность вздрагивания, хоть и не достоверно ($p = 0.08$).

Латентное торможение: Мыши всех экспериментальных групп не отличались по периоду А (p 's > 0.05; среднее значение периода А = 8.1 сек.). MANOVA обнаружил достоверное влияние пре-экспозиции [$F(1,86) = 30.3$; $p < 0.001$], генотипа [$F(1,86) = 13.1$; $p < 0.001$], генотип \times МИА+антитела к ИЛ-6 [$F(2,86) = 10.1$; $p < 0.001$], пре-экспозиция \times МИА + антитела к ИЛ-6 [$F(2,86) = 8.2$; $p < 0.001$] взаимодействия на латентное торможение. Мыши +/+ от PBS-самок продемонстрировали латентное торможение ($p < 0.001$), в то время как у PolyI:C-100P/+ мышей наблюдалось нарушение латентного торможения ($p > 0.05$), однако введение антител к ИЛ-6 совместно с PolyI:C не вызывало нарушения данного типа поведения (Рис. 36В).

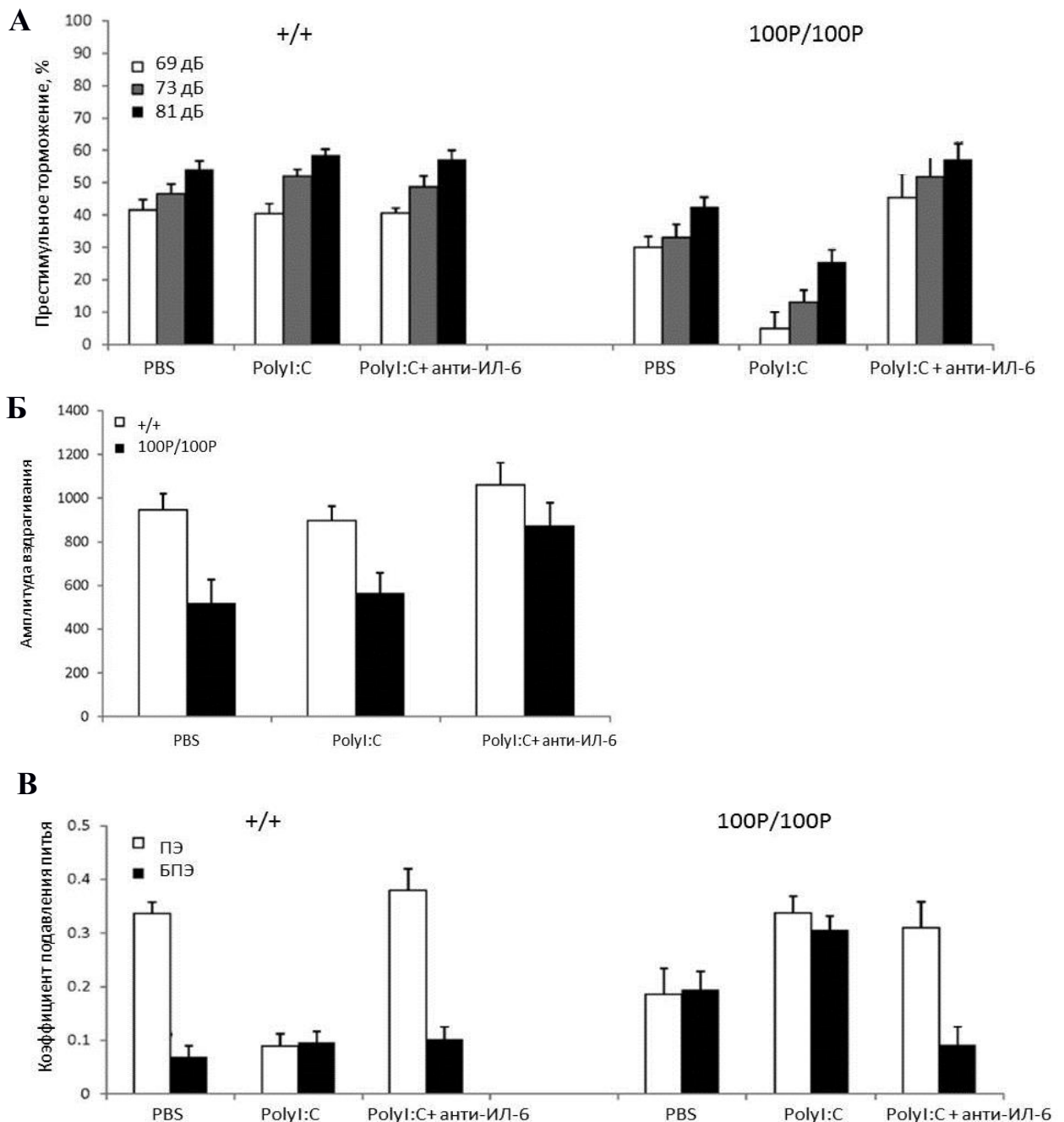


Рис. 36А-В. Совместное введение антител к ИЛ-6 (анти-ИЛ-6) с PolyI:C (2.5 мг/кг) предотвращало дефицит престаимпульного торможения (А) и латентного торможения (В) у 100P/+ гетерозиготных мышей. **А.** 100P/+ мыши, рожденные от матерей имевших иммунную активацию, вызванную PolyI:C, продемонстрировали дефицит престаимпульного торможения. Введение анти-ИЛ-6 совместно с PolyI:C нормализовало дефицит престаимпульного торможения и амплитуду вздрагивания (**Б**). N = 8-9, * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с PBS группой внутри 100P/+; # - $p < 0.05$; ## - $p < 0.01$; ### - $p < 0.001$ – по сравнению с PBS группой внутри ++ группы. **В.** Коэффициент подавления питья у экспериментальных животных с пре-экспозицией к тону (ПЭ) и без пре-экспозиции к тону (БПЭ) при обучении с 2 парами тон-шок и 40 пре-экспозициям к тону. N = 6-9; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с ПЭ группой внутри каждой экспериментальной группы.

Заключение к Главе 6

Данное исследование, во-первых, продемонстрировало специфичность и патогенность точечной мутации DISC1-L100P, имеющей отношение к психопатологическим процессам шизофреноподобного состояния. Действительно, введение PolyI:C в дозе 5 мг/кг оказывало сходный эффект на мышей дикого типа ++ и на 31L/+ линию мышей, в то время как материнская иммунная активация, вызванная пониженной дозой PolyI:C, провоцировала шизофреноподобное поведение только у 100P/+ гетерозиготных животных, не оказывая действия на мышей дикого типа. Гетерозиготные животные с 100P/+ мутацией проявили предрасположенность к шизофреноподобному поведению, поскольку материнская иммунная активация (МИА) спровоцировала у них развитие данного типа психопатологии. Во-вторых, полученные данные доказали роль DISC1-L100P в процессах нейроразвития, учитывая воздействие МИА на ранней стадии эмбриогенеза. В-третьих, показано, что МИА посредством провоспалительного цитокина ИЛ-6 опосредует шизофреноподобное поведение у 100P/+ гетерозиготных мышей. Наконец, комбинация 100P/+ с МИА у мышей представляет собой новую гибридную модель шизофрении, сочетая два этиологических фактора данного заболевания, и в большей степени соответствуя ситуации в человеческой популяции, поскольку генетические, этиологические и нейробиологические исследования доказали, что шизофрения является результатом совместного действия патогенной генетической мутации(й) с факторами окружающей среды (O'Tuathaigh et al., 2015; van Os et al., 2010). Следовательно, последующие исследования на данной гибридной модели откроют новые нейробиологические механизмы, особенно, касающиеся нейроглиальных взаимодействий в процессе нейроразвития шизофреноподобного поведения.

Глава 7. ПОИСК И ВАЛИДАЦИЯ НОВЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПРЕВЕНТИВНОЙ ТЕРАПИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ ВАЛЬПРОАТА НА ШИЗОФРЕННОПОДОБНЫЕ ЭНДОФЕНОТИПЫ 100P/100P МЫШЕЙ

Шизофрения является болезнью нейроразвития (Lewis and Lewitt, 2002), где первые симптомы заболевания отмечают в подростковый период. В настоящее время особо актуальным является исследование молекулярно-клеточных механизмов развития патологических процессов шизофрении с целью ее ранней диагностики и превенции. Предыдущее исследование, используя 100P/+ х МИА модель, косвенно продемонстрировало вовлечение DISC1-L100P в процессы нейроразвития, а также многочисленные независимые результаты доказали непосредственный вклад DISC1 в процессы пролиферации, миграции, интеграции нейронов (Mao et al., 2009; Singh et al., 2010; Kamiya et al., 2005; Kubo et al., 2010; Young-Pearse et al., 2010). Следовательно, на следующем этапе исследования представлялось актуальным оценить 1) проявление шизофреноподобного поведения у 100P/100P мутантных мышей в процессе нейроразвития; 2) возможность предотвращения данной психопатологии; 3) выявить новую молекулярную мишень, вовлеченную в процессы формирования шизофреноподобного поведения с чувствительностью к превентивной терапии.

7.1. Проявление шизофреноподобных эндофенотипов у 100P/100P мышей в возрасте 16 недель, но не 8 недель

Поведение 100P/100P мутантных мышей оценивали в подростковый период, в возрасте 8 недель, когда уже созревает функциональность престаимпульного торможения и латентного торможения (Willott et al., 2003; Zheng et al., 1999; Zuckerman et al., 2003), а также во взрослом состоянии, в возрасте 12 недель. Оценивали основные поведенческие эндофенотипы, относящиеся к шизофреноподобному поведению, гиперактивность, престаимпульное торможение и латентное торможение (Arguello and Gogos, 2006).

Двигательная активность: MANOVA выявил эффект генотипа [$F(1,22) = 4.5$; $p < 0.05$], возраста [$F(1,22) = 17.1$; $p < 0.001$] и их взаимодействия [$F(1,22) = 9.4$; $p < 0.01$] на пройденное расстояние. 100P/100P мутанты проявляли гиперактивность в возрасте 12 недель, но не 8 недель (Рис. 37А).

Престаимпульное торможение акустической реакции вздрагивания: MANOVA обнаружил достоверное влияние престаимулов [$F(2,98) = 150.2$; $p < 0.001$], генотипа [$F(1,49) = 58.8$; $p < 0.001$], возраста [$F(1,49) = 4.97$; $p \leq 0.05$], и генотип х возраст взаимодействий [$F(1,49) = 9.3$; $p < 0.01$] на престаимпульное торможение. Дефицит престаимпульного торможения был существенно выражен у 100P/100P мышей в возрасте 12 недель по сравнению с 8-недельным возрастом (Рис. 37Б). MANOVA обнаружил

достоверный эффект генотипа [$F(1,49) = 19.9$; $p < 0.001$], и генотип \times возраст взаимодействий [$F(1,49) = 8.6$; $p < 0.01$] на амплитуда акустической реакции вздрагивания. Интенсивность реакции вздрагивания у 100P/100P мутантов в возрасте 8 недель не отличалась от данного показателя у ++ мышей (Рис. 37В), но достоверно снижалась у 12-недельных мышей ($p < 0.001$).

Латентное торможение: MANOVA выявил достоверный эффект пре-экспозиции к тону [$F(1,47) = 49.1$; $p < 0.001$], генотипа [$F(1,47) = 19.1$; $p < 0.001$], возраста [$F(1,47) = 15.4$; $p < 0.001$] и пре-экспозиция \times генотип \times возраст взаимодействий [$F(1,47) = 4.5$; $p < 0.05$] на латентное торможение. 100P/100P мыши в возрасте 8 недель проявляли латентное торможение ($p = 0.07$), но дефицит латентного торможения наблюдался у 12-недельных 100P/100P мутантных мышей (Рис. 37Г).

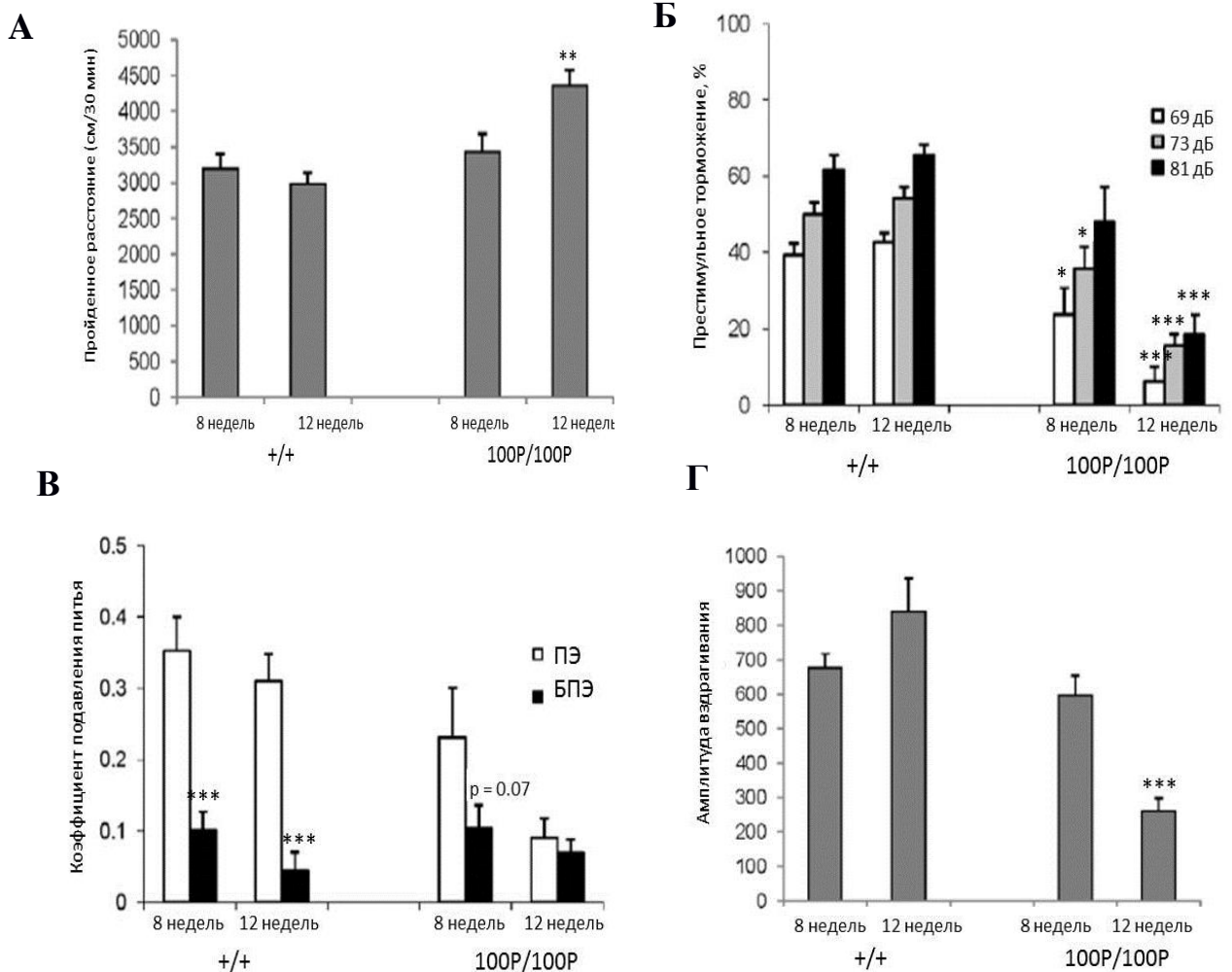


Рис. 37А-Г. 100P/100P мутантные мыши проявляют шизофреноподобное поведение в возрасте 12 недель, но не в 8 недель. **А.** 12-недельные 100P/100P мыши продемонстрировали гиперактивность по сравнению с мышами дикого типа (+/+) (N = 7-19) оцененной по общему пройденному расстоянию за 30 минут в тесте «открытое поле»; **Б.** 12-недельные 100P/100P мутанты проявили дефицит престаимпульного торможения, а также интенсивность акустической реакции вздрагивания (**В**) (N = 7-10); * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с мышами дикого типа внутри каждой возрастной группы. **Г.** 12-недельные 100P/100P мыши проявили дефицит латентного торможения. Животные восьми экспериментальных групп не различались по периоду А (времени, затраченному на выполнение 25 лизков до подачи обусловленного тона) (N = 6-8). *** - $p < 0.001$ – по сравнению с ПЭ группой внутри каждого генотипа и возрастной группы.

7.2. Превентивная эффективность вальпроата на шизофреноподобные эндофенотипы 100P/100P мышей

Следующим этапом исследование была оценка превентивной эффективности хронического введения вальпроата (200 мг/кг) экспериментальным животным в возрасте с 10 по 12 неделю с последующей оценкой шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей в возрасте 12 и 15 недель. В качестве превентивного средства вальпроат был выбран по нескольким причинам. Во-первых, использование антипсихотиков в качестве превентивной медицины является ограниченным (Marshall and Rathbone, 2011). Во-вторых, вальпроат уже одобрен для применения подростками в качестве стабилизатора настроения, противосудорожного средства и превенции психозов (Monti et al., 2009; Perucca and Tomson, 2011; Lambert et al., 2016). В-третьих, поскольку шизофрению вызывают множественные факторы, взаимодействующие на нескольких биологических уровнях (Kirkbride and Jones, 2011), то подходящим превентивным соединением, возможно, окажется такое средство, которое воздействует на несколько механизмов действия (Buchanan et al., 2009). Вальпроат оказывает действие на несколько внутриклеточных биохимических каскадов (Phiel et al., 2001; Williams et al., 2002; Kim et al., 2007; Chateauvieux et al., 2010) и мишеней, включая ГАМК трансминазу, натриевые каналы, GSK-3, гистон деацетилазы (HDACs) (Monti et al., 2009).

Оказалось, что 2х-недельное введение вальпроата корректировало гиперактивность и дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мышей в возрасте 12 недель (Рис. 38А,Б). Более того, эффект вальпроата на оцениваемое поведение сохранялся спустя 3 недели после отмены введения препарата, т.е. в возрасте 15 недель. Вальпроат оказывал отставленный эффект на дефицит латентного торможения у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 38В), поскольку 100P/100P мыши проявляли дефицит латентного торможения в возрасте 12 недель (на фоне введения вальпроата), но не в 15-недельном возрасте.

Гиперактивность: MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [F (1,41) = 8.4; p < 0.001], препарата [F (1,41) = 12.5; p < 0.001] и их взаимодействия [F (1,41) = 5.6; p < 0.05] на пройденное расстояние в тесте «открытое поле» в течение 30 минут. 100P/100P мыши на фоне введения физиологического раствора проявляли гиперактивность по сравнению с контрольной группой животных (Рис. 38А,Г). Вальпроат оказывал превентивное действие как 20 часов спустя после последнего введения вальпроата, так и 3 недели после отмены препарата.

Престимульное торможение акустической реакции вздрагивания: MANOVA обнаружил влияние престимулов [F (2,82) = 4.4; p < 0.05], генотипа [F (1,41) = 7.6; p < 0.01], препарата [F (1,41) = 5.5; p < 0.05], и генотип x препарат взаимодействия [F (1,82) = 9.6; p < 0.01] на престимульное торможение. Вальпроат оказывал терапевтическое действие на дефицит престимульного торможения у 100P/100P мутантных мышей (Рис. 38Б,Д). MANOVA выявил эффект генотипа [F (1,41) = 32.4, p < 0.001] но не вальпроата [F (1,41) = 4.7, p > 0.05] на амплитуду реакции вздрагивания в возрасте 12 недель. MANOVA идентифицировал влияние препарата [F (1,40) = 3.87, p ≤ 0.05] и тенденцию к достоверному влиянию генотип x вальпроат взаимодействий [F (1,40) = 4.4, p = 0.07] на амплитуду реакции вздрагивания в возрасте 15 недель (Табл. 7).

Латентное торможение: MANOVA выявил эффект пре-экспозиции [F (1,43) = 43.0; p < 0.001], генотипа [F (1,43) = 51.1; p < 0.001], генотип x пре-экспозиция [F (1,43) = 33.5; p < 0.001] и генотип x пре-экспозиция x препарат взаимодействий [F (1,43) = 12.5; p < 0.05] на латентное торможение. 100P/100P мутантные мыши проявили дефицит латентного торможения на фоне хронического введения физиологического раствора и вальпроата (p's > 0.05), однако спустя 3 недели после отмены введения вальпроата 100P/100P продемонстрировали латентное торможение (p < 0.01) (Рис. 38В,Е).

Таблица 7. Эффекты вальпроата на амплитуду акустической реакции вздрагивания у мышей дикого типа (+/+) и 100P/100P

Генотип/Вальпроат	Физ. р-р	Вальпроат
20 часов спустя после введения вальпроата		
+/+ (n=16/18)	920.1 ± 89.1	943.6 ± 142.8
100P/100P (n=16/19)	512.1 ± 150.2 *	676.3 ± 107.1 #
3 недели спустя после введения вальпроата		
+/+ (n=11/12)	833.6 ± 57.7	827.6 ± 66.8
100P/100P (n=10/11)	447.8 ± 58.6 *	716.5 ± 82.9 #

- p < 0.05 – по сравнению с 100P/100P мышами на фоне введения физиологического раствора, * < 0.05 – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физиологического раствора.

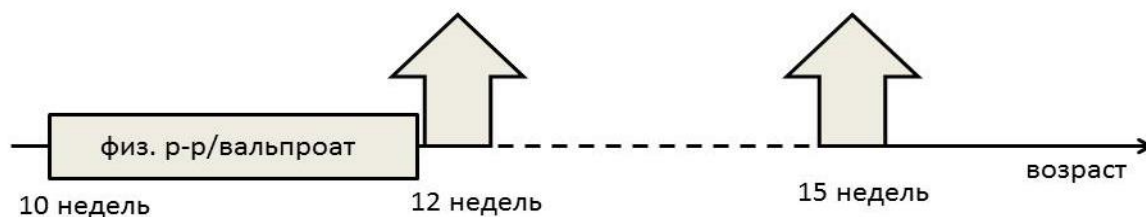
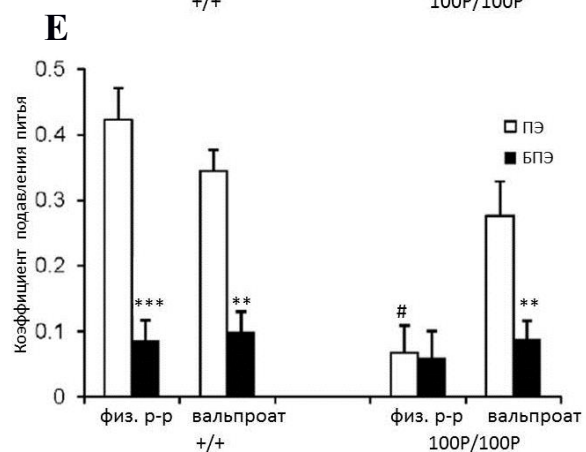
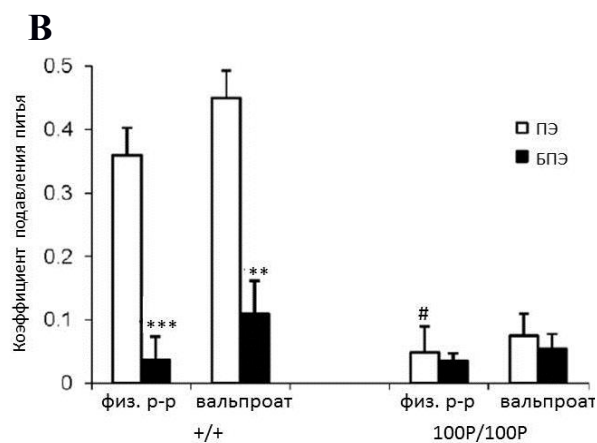
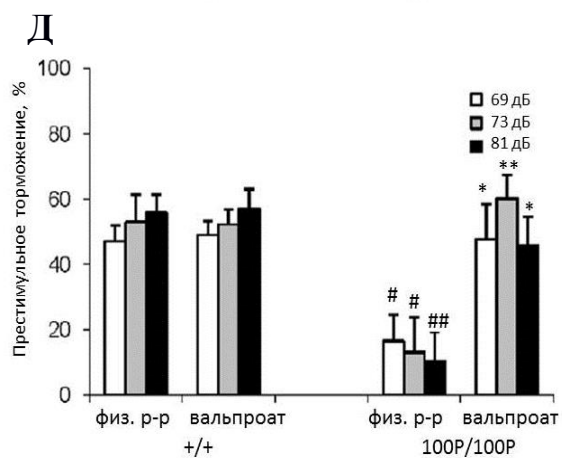
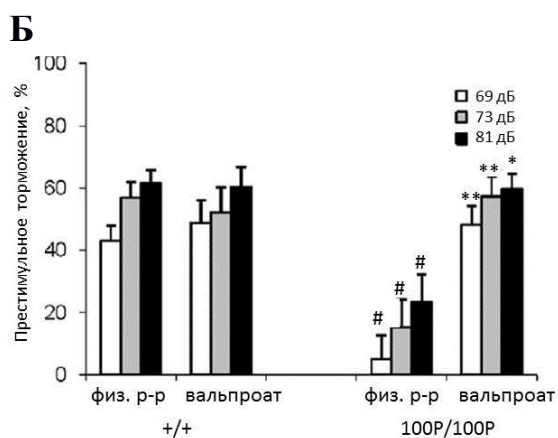
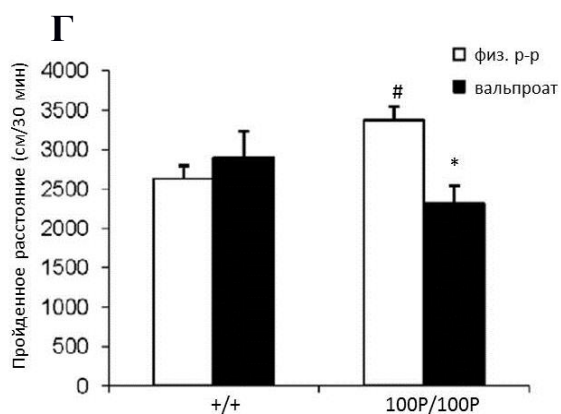
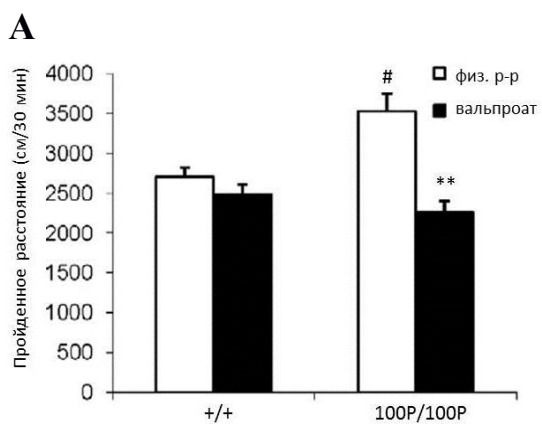


Рис. 38А-Г. Хроническое введение вальпроата экспериментальным мышам в возрасте 10-12 недель предотвращало гиперактивность и дефицит престаимпульного торможения и оказывало отставленное действие на дефицит латентного торможения. **А.** В возрасте 12 недель вальпроат снижал гиперактивность у 100P/100P мышей, не влияя на двигательную активность +/- мышей (N = 8-15); предотвращал дефицит престаимпульного торможения у 100P/100P мышей (**Б**) (N = 16-19), но не латентного торможения (**В**) (N = 8-12). **Г-Е.** Вальпроат оказывал отставленный эффект спустя 3 недели после прекращения его введения на (**Г**) гиперактивность [F (1,42) = 9.8; p < 0.001 – эффект генотипа; F (1,42) = 11.4; p < 0.01], на дефицит престаимпульного торможения [F(1,40) = 5.7; p < 0.05 – эффект препарата; F(1,40) = 5.5; p < 0.05 – эффект генотипа; F(2,84) = 21.6; p < 0.01 – эффект престаимула] (**Д**) у 100P/100P мутантных мышей. # - p < 0.05; ## - p < 0.01 – по сравнению с мышами дикого типа (+/+) на фоне введения физиологического раствора; * - p < 0.05; ** - p < 0.01 – по сравнению с 100P/100P на фоне введения физиологического раствора. 100P/100P мыши продемонстрировали латентное торможение после прекращения введения вальпроата спустя 3 недели (**Е**) [F (1,43) = 12.8; p < 0.001 – эффект генотипа; F (1,43) = 15.2; p < 0.001 – эффект препарата; F (1,43) = 47.9; p < 0.001 – эффект пре-экспозиции к тону]. # - p < 0.001 – по сравнению с +/- мышами на фоне введения физиологического раствора; ** - p < 0.01; *** p < 0.001 – по сравнению с группой имеющих пре-экспозицию к тону (ПЭ) внутри каждой экспериментальной

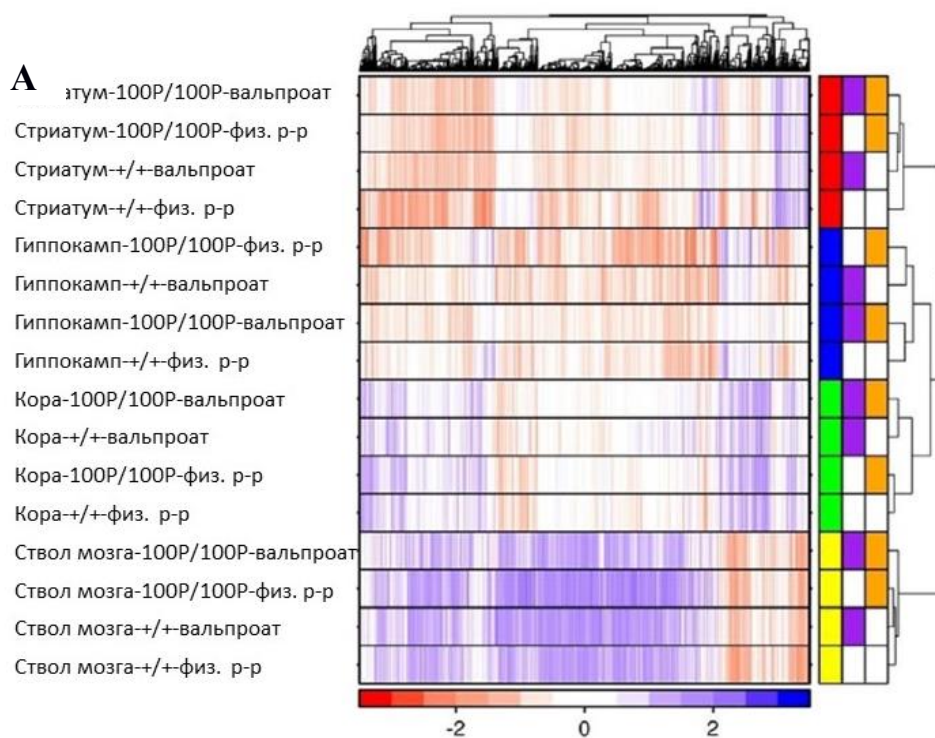
7.3. Эффекты DISC1-L100P мутации, вальпроата и их взаимодействия на уровень экспрессии генов в структурах головного мозга и идентификация липокалина-2 (Lcn2) как гена-кандидата для ранней диагностики и создания превентивной терапии

Транскриптомный анализ выявил, что DISC1-L100P мутация имела наиболее выраженный эффект на экспрессию генов в гиппокампе (61 ген), 13 генов изменили экспрессию в стволе головного мозга и не было обнаружено изменений генетической экспрессии в стриатуме и коре головного мозга (Таблица 8, Рис. 39А). Аннотация функций генов гиппокампа выявила, что большинство из них вовлечены в пролиферацию клеток (23%) и цитоскелет/форму клетки (15%). Вальпроат значительно изменял экспрессию 3 генов в гиппокампе (Hist1h1c, Hist1h2be, Clcn2) и 2 генов в стриатуме (Egr2, Fosb). Среди 61 генов, изменивших свою экспрессию под влиянием DISC1-L100P мутации, вальпроат скорректировал экспрессию 13 генов (21.3%) в гиппокампе и Lcn2 в стволе головного мозга. Экспрессия 14 генов изменилась только у 100P/100P мышей на фоне действия вальпроата (Приложение 1, Таблицы 2-6).

Таблица 8. Количество генов с измененной экспрессией под влиянием мутации (DISC1-L100P), вальпроата (препарат) и их взаимодействий в четырёх отделах головного мозга.

Отдел головного мозга	Вальпроат	100P/100P	100P/100P x Вальпроат взаимодействия
Ствол головного мозга	0	13	2
Фронтальная кора	0	0	2
Стриатум	2	0	0
Гиппокамп	3	61	30

Затем, использовали детекцию ПЦР продукта в режиме реального времени (qRT-PCR) для подтверждения выявленного повышенного уровня мРНК для генов, которые меняли свою экспрессию под влиянием: 1) 100P/100P мутации и вальпроата (ген x препарат взаимодействия) (Arc, Purb, Egr2, Dusp1, Slc40a1, Mrpl39, Igf1); 2) только 100P/100P мутации (Slc6a12, Adar, Lcn2, Ei4ebp2); 3) генотип x препарат взаимодействия (Cyr61). Корреляционный анализ данных, полученных транскриптомным анализом (микрочип) и qRT-PCR подтвердил достоверное изменение экспрессии 7 генов из 12 исследуемых – Lcn2, Egr2, Slc40a1, Arc, Dusp1, Cyr61, Slc6a12, где коэффициент корреляции составил $r = 0.6$; $p = 0.037$ (Рис. 37Б). На основе транскриптомного анализа и первичной валидации с помощью qRT-PCR наилучшим геном-кандидатом оказался ген Lcn2 (Рис. 37В-Д). Вторичная валидация Lcn2 подтвердила изменения его экспрессии на уровне протеина, соответствующие генетическим (Рис. 39Г-Д). В частности, наблюдалась повышенная экспрессия Lcn2 в стволе головного мозга у 100P/100P мутантов, существенно корректируемая вальпроатом.



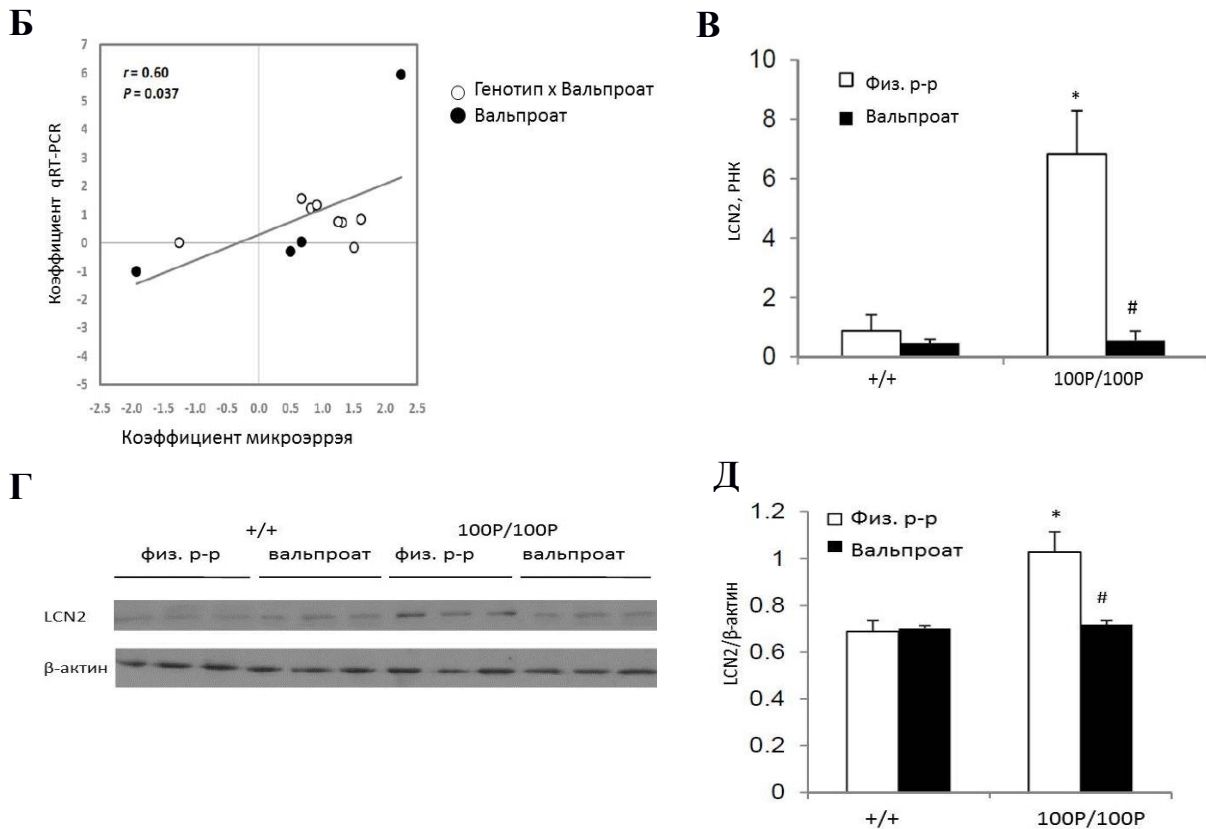


Рис. 39А-Д. Изменения генетической экспрессии, вызванные DISC1-L100P мутацией и вальпроатом. **А.** Теплокарта, полученная на основе данных микроэстррей, отражающих уровни экспрессии генов экспериментальных групп. Колонки теплокарты представляют экспрессию индивидуальных генов, ряды отражают каждую экспериментальную группу (отдел мозга, генотип, препарат). Цветовая кодировка внизу теплокарты указывает на интенсивность сигнала, где синий цвет обозначает максимальную экспрессию. Цветовые ряды, расположенные справа теплокарты, обозначают слева направо: отдел мозга (красный – стриатум, синий – гиппокамп, зеленый – фронтальная кора, желтый – ствол мозга), препарат (фиолетовый – вальпроат, белый – физ. р-р) и генотип (оранжевый – 100P/100P (DISC1-L100P), белый - +/+ (дикий тип)). **Б.** Валидация данных микроэстррей: *Arc*, *Egr2*, *Dusp1*, *Purb*, *Slc40a1*, *Adar*, *Mrpl39*, *Slc6a12*, *Lcn2*, *Igf1*, *Eif4ebp2*, *Cyr61* транскрипты анализировали с помощью детекции ПЦР продукта в режиме реального времени (qRT-PCR). Коэффициентами данных, полученных с помощью qRT-PCR и микроэстррей, являются кратные изменения экспрессии генов, при нормализации на *Gapdh* и β-актин. Линейный коэффициент корреляции г-Пирсона (r); уровень достоверности корреляции (p); В-Д. Повышенная экспрессия *Lcn2* (*lipocalin2*; липокалин-2) у 100P/100P мутантов нормализовалась под влиянием вальпроата. **В.** Уровень *Lcn2* мРНК, оцениваемый с помощью qRT-PCR ($N = 5-6$). RNE - значения экспрессии мРНК при нормализации на *Gapdh* и β-актин. MANOVA выявил эффект генотипа [$F(1,15) = 18.4$, $p < 0.001$], препарата [$F(1,15) = 20.6$; $p < 0.001$], и генотип x препарат взаимодействий [$F(1,15) = 18.2$; $p < 0.001$] на уровень экспрессии *Lcn2* мРНК. **Г.** Уровень *Lcn2* протеина, оцениваемый с помощью вестерн блота, используя антитела к *Lcn2* и β-актин (контроль) в лизатах ствола головного мозга у экспериментальных животных ($N = 6-7$). **Д.** Денситметрический анализ количественной оценки интенсивности *Lcn2* иммунореактивных полос по отношению к β-актину. MANOVA обнаружил эффект генотипа [$F(1,20) = 31.4$; $p < 0.001$], препарата [$F(1,20) = 21.9$; $p < 0.001$] и их взаимодействий [$F(1,20) = 25.9$; $p < 0.001$] на уровень *Lcn2* протеина. * - $p < 0.05$ – по сравнению с +/+ мышами на фоне введения физ. раствора; # - $p < 0.05$ – по сравнению с 100P/100P мутантами на фоне введения физ. раствора.

7.4. Повышенное количество глиальных клеток в области рострального миграционного тракта у 100P/100P мышей

Учитывая, что DISC1 (Enomoto et al., 2009; Mao et al., 2009; Kim et al., 2009) и Lcn2 (Rodvold et al., 2012) вовлечены в клеточную пролиферацию и поскольку наибольшую часть генов с изменённой экспрессией составляли гены, также вовлечённые в пролиферацию, на следующем этапе исследовали клеточную пролиферацию у экспериментальных животных, используя маркер $ki67$. Было выявлено повышенное количество $ki67^+$ клеток у мутантных мышей 100P/100P на фоне введения физиологического раствора (Рис. 40А-Б) в обонятельных луковицах, росто-миграционном тракте, субвентрикулярной зоне головного мозга, но не в субгранулярной зоне гиппокампа. Данные структуры мозга являются основными областями нейрогенеза у взрослых организмов (Zhao et al., 2008). Хроническое введение вальпроата корректировало повышенную пролиферацию у 100P/100P мышей (Рис. 40А-Б), не оказывая действия на мышей дикого типа.

Затем, для идентификации типов пролиферирующих клеток были использованы селективные маркеры для нейронов – антитела для NeuN (neuronal nuclear protein) и глиальных клеток (астроцитов) – антитела для GFAP (glial fibrillary acidic protein). Как видно (Рис. 40В-Г), в области обонятельных луковиц, росто-миграционного тракта, субвентрикулярной зоны головного мозга, но не в гиппокампе, у 100P/100P наблюдалось повышенное количество $GFAP^+$ клеток по сравнению с мышами дикого типа. В то время как не было обнаружено межгенетических отличий по количеству $NeuN^+$ нейрональных клеток во всех исследованных областях мозга (Приложение, Таблица 7). Для исключения вклада апоптоза в наблюдаемое повышение числа пролиферирующих клеток у 100P/100P также была проведена оценка гибели клеток с использованием маркера – антител TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling). Межгенетических отличий по числу $TUNEL^+$ клеток выявлено не было (Приложение, Таблица 8).

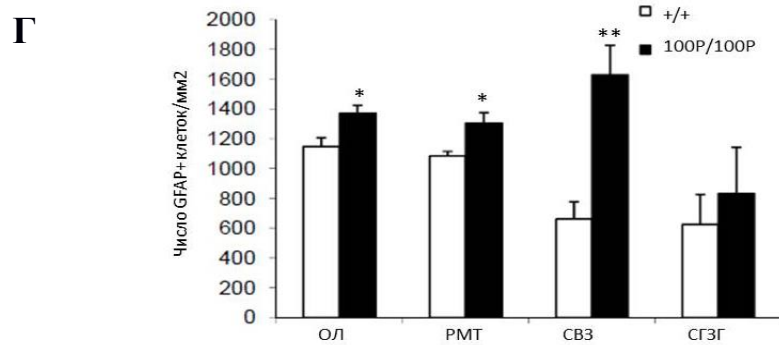
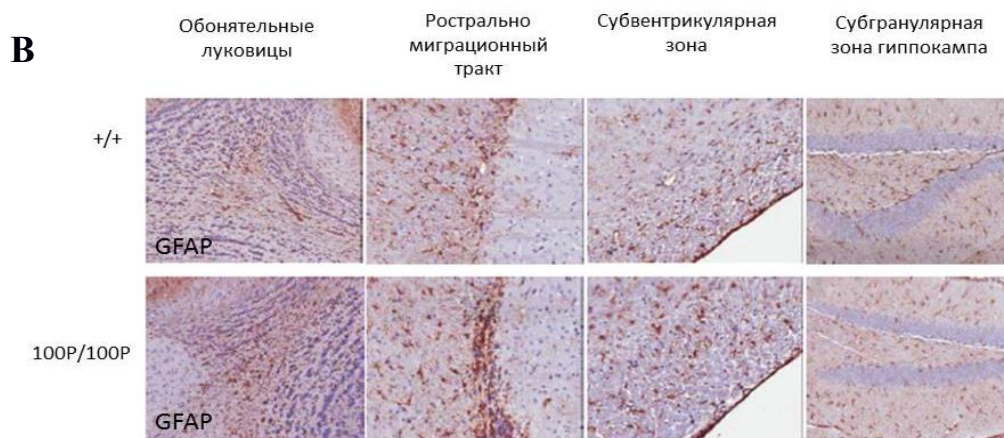
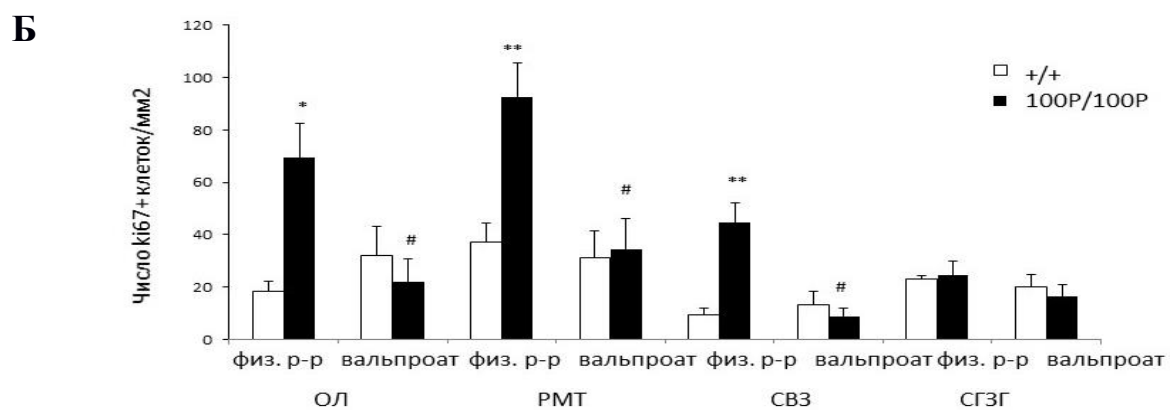
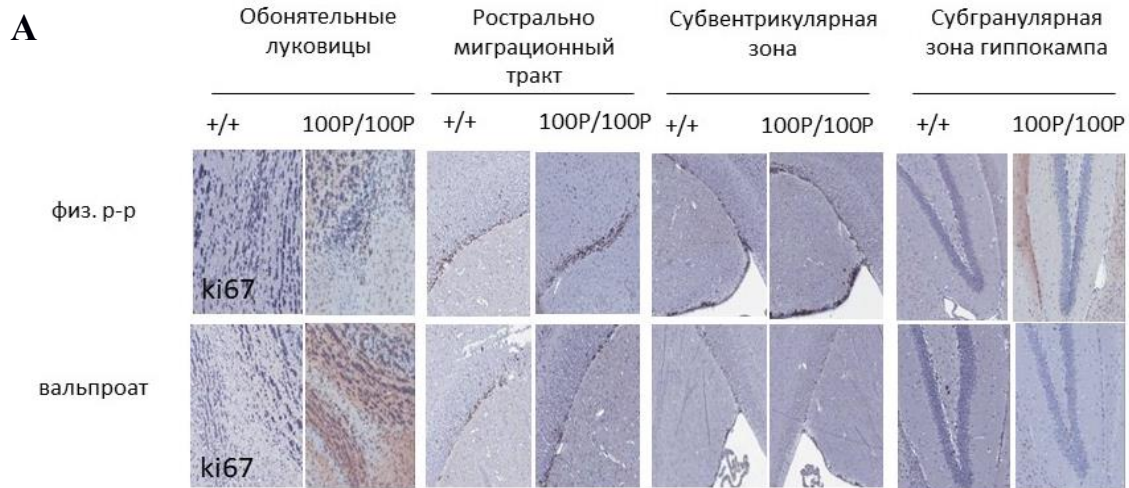
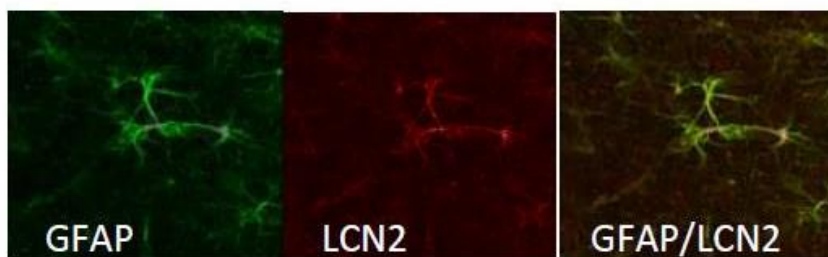


Рис. 40А-Г. Повышенная пролиферация GFAP⁺ клеток у 100P/100P мутантов нормализовалась хроническим введением вальпроата. **А.** Иллюстративные срезы обонятельных луковиц, росто миграционного тракта, субвентрикулярной зоной, субгранулярной зоны гиппокампа у мышей дикого типа (+/+) и мутантов (100P/100P) на фоне введения физиологического раствора (верхняя панель) и вальпроата (нижняя панель) иммуноокрашенных с меткой ki67 (тёмно-коричневый цвет). Все изображения получены при увеличении $\times 10$. **Б.** Количественный анализ числа ki67⁺ клеток в обонятельных луковицах (ОЛ), росто-миграционном тракте (PMT), субвентрикулярной зоне (СВЗ), субгранулярной зоне гиппокампа (СГЗГ) у животных всех экспериментальных групп. *ОЛ*: [F (1,62) = 18.23; $p < 0.01$] – генотип; [F (1,62) = 18.9; $p < 0.01$] – препарат; [F (1,62) = 19.4; $p < 0.01$] – генотип \times препарат взаимодействия. *PMT*: [F (1,62) = 17.38; $p < 0.01$] – генотип; [F (1,62) = 28.47; $p < 0.01$] – препарат; [F (1,62) = 15.71; $p < 0.05$] – препарат \times генотип. *СВЗ*: [F (1,62) = 28.54; $p < 0.01$] – генотип; [F (1,62) = 16.28; $p < 0.05$] – препарат, [F (1,62) = 16.54; $p < 0.01$] – генотип \times препарат. *СГЗГ*: MANOVA не выявил достоверных влияний генотипа, препарата и их взаимодействий на число GFAP⁺ клеток (p 's > 0.05). Число ki67⁺ клеток выражается как число клеток на 1 мм² используя программу Aperio Image Score. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с мышами дикого типа (+/+) на фоне введения физ. раствора; # - $p < 0.01$ – по сравнению с 100P/100P мутантами на фоне введения физ. раствора. N = 4 среза на 1 мыш; 4-6 мышей на группу. **В.** Иллюстративные срезы обонятельных луковиц, росто-миграционного тракта, субвентрикулярной зоной, субгранулярной зоны гиппокампа у мышей дикого типа (+/+) и мутантов (100P/100P) иммуноокрашенных с меткой GFAP (коричневый цвет). Все изображения сделаны при увеличении $\times 20$. **Г.** Количественная оценка числа GFAP⁺ ядер клеток в обонятельных луковицах (ОЛ), росто-миграционном тракте (PMT), субвентрикулярной зоне (СВЗ) и субгранулярной зоне гиппокампа (СГЗГ). *ОЛ*: [F(1,30) = 7.71; $p < 0.01$] – генотип, *PMT*: [F (1,30) = 8.18; $p < 0.01$], *СВЗ*: [F(1,30) = 8.81; $p < 0.05$], *СГЗГ*: [F(1,30) = 0.39; $p > 0.05$]. Число GFAP⁺ клеток выражается как количество клеток на 1 мм² используя Aperio Image Score. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с +/+ мышами. N = 4 среза на 1 мыш; 4-6 мышей на группу.

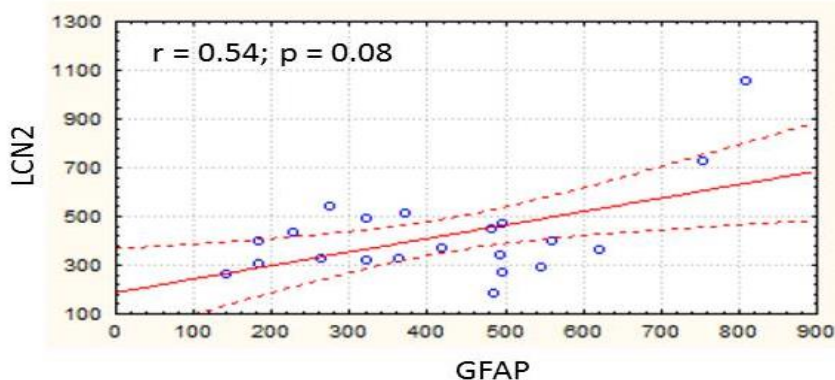
7.5. Взаимосвязь между экспрессией Lcn2, количеством глиальных клеток в области рострального миграционного тракта и проявлением шизофреноподобных эндотипов у 100P/100P мышей

Для выяснения вклада Lcn2 гена в опосредование повышенного числа глиальных клеток и ассоциацию с шизофреноподобным поведением 100P/100P мышей, данная генетическая линия мышей была скрещена с Lcn2 нокаутной линией (Lcn2-KO) (Berger et al 2006). Lcn2 является аутокринным посредником реактивного астроцитоза (Lee et al 2009), связанный с пролиферацией глии. Одновременное иммуноокрашивание с двумя антителами к Lcn2 и GFAP выявило их совместную экспрессию в обонятельных луковицах (ОЛ), росто миграционном тракте (PMT), субвентрикулярной зоне (СВЗ), коре, субгранулярной зоне гиппокампа и стволе головного мозга (Рис. 41А). Уровень экспрессии Lcn2 положительно коррелировал с числом GFAP⁺ клеток ($r = 0.53$; $p < 0.01$) (Рис. 41Б). 100P/100P мутация повышала уровень Lcn2 и GFAP в СВЗ (Рис. 41В-Г).

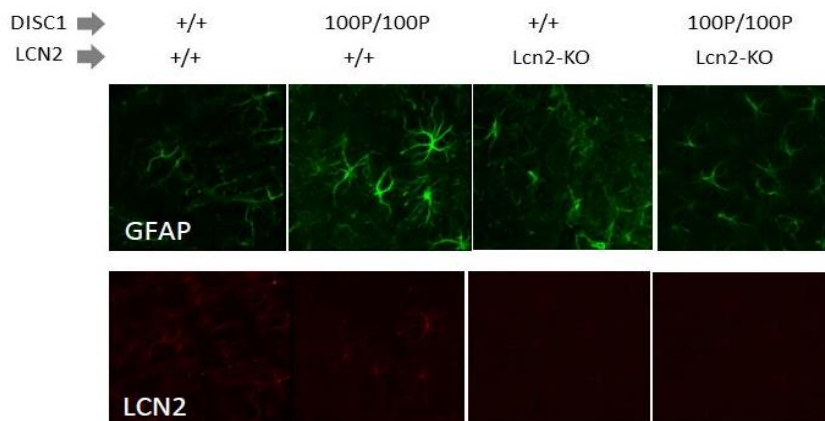
А



Б



В



Г

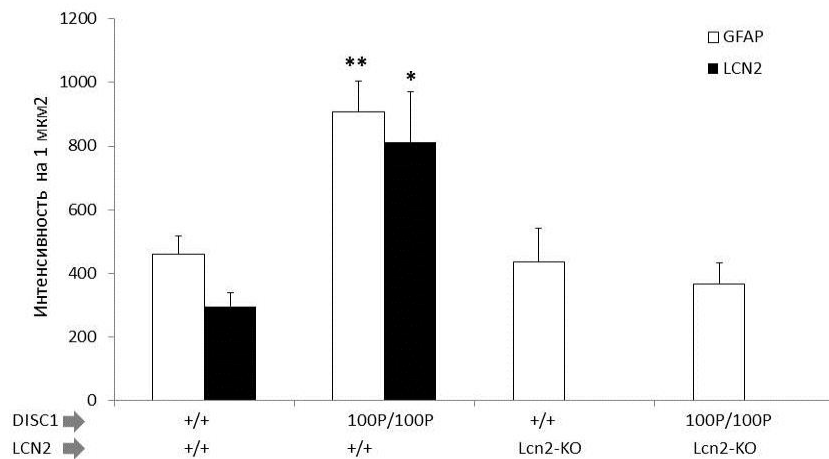
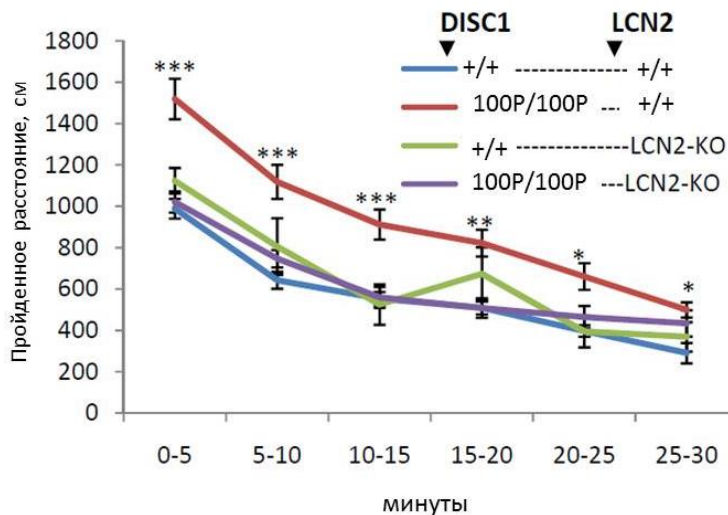


Рис. 41А-Г. Совместная внутриклеточная экспрессия *Lcn2* с GFAP в клетках головного мозга у мышей. **А.** Конфокальная нейровизуализация ко-экспрессии *Lcn2* с GFAP на кортикальных срезах головного мозга мышей, используя антитела к *Lcn2* и GFAP. Изображения получены при увеличении $\times 20$. **Б.** Корреляция между уровнем экспрессии *Lcn2* и GFAP в разных отделах головного мозга, включая обонятельные луковицы (ОЛ), росто миграционный тракт (ПМТ), субвентрикулярную зону (СВЗ), субгранулярную зону гиппокампа (СГЗГ) и кору головного мозга ($N = 21$). Уровень GFAP и *Lcn2* выражается как интенсивность на $1 \mu\text{m}^2$, используя программу для анализа изображений (EZ-C1, gold v3.9, Nikon Corporation). **В.** Генетическая инактивация *Lcn2* корректировала повышенное число GFAP⁺ клеток в СВЗ у 100P/100P мутантных мышей. Конфокальная нейровизуализация срезов СВЗ с иммуноокрашиванием, используя антитела к *Lcn2* и GFAP у мышей 4х генотипов: дикий тип (+/++/+); 100P/100P+/+; +/+Lcn2-KO; 100P/100P-Lcn2-KO ($N = 4$ среза на 1 мышь; 3-5 мышей на генотип, увеличение $\times 20$). **Г.** Количественный анализ уровня *Lcn2* и GFAP в СВЗ у мышей 4х генотипов. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ – по сравнению с +/+ мышами, непарный t-тест.

Наконец, было оценено шизофреноподобное поведение у мышей таких генотипов как +/++/+; 100P/100P+/+; +/+Lcn2-KO; 100P/100P-Lcn2-KO. Генетическая инактивация двух аллелей *Lcn2* гена корректировала гиперактивность, дефицит престаимпульного торможения, и нарушение латентного торможения (Рис. 42А-В) у 100P/100P мышей.

А



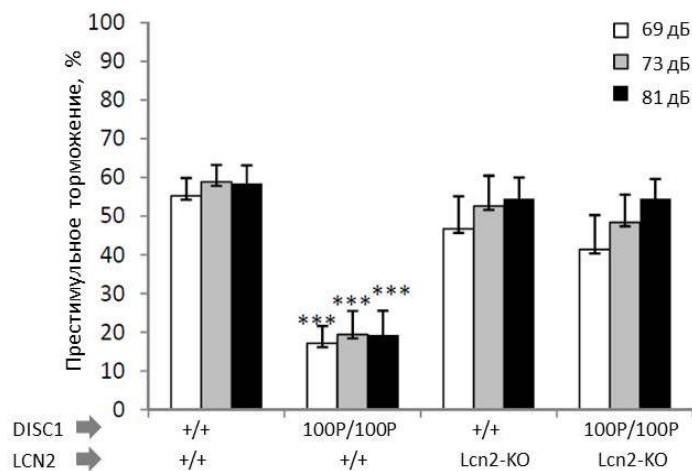
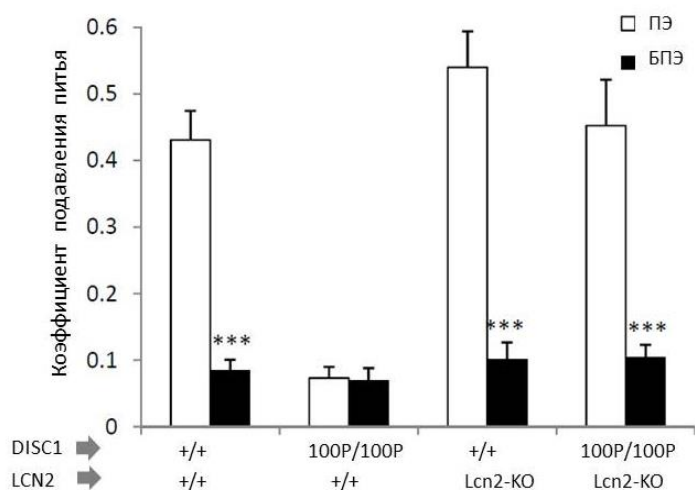
Б**В**

Рис. 42А-В. Генетическая инактивация *Lcn2* корректировала шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей, включая гиперактивность, дефицит престаимulatoryного торможения и латентного торможения. **А.** Двигательная активность в тесте «открытое поле» у +/+ или 100P/100P мышей, несущих оба аллеля *Lcn2* (+/+) или их отсутствие (*Lcn2*-KO). ANOVA с повторяющимися измерениями выявил достоверный эффект генотипа [$F(3,43) = 11.4$; $p < 0.001$], временных интервалов [$F(5,215) = 137.4$; $p < 0.001$] и генотип x временной интервал взаимодействия [$F(15,215) = 3.2$; $p < 0.001$] на пройденное расстояние. 100P/100P мутанты проявили гиперактивность в течение всех 30 минут, в то время как генетическое отсутствие *Lcn2* у 100P/100P нормализовало их двигательную активность до контрольного уровня +/+ мышей. $N = 6-17$ мышей; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ – по сравнению с +/+ мышами. **Б.** Дефицит престаимulatoryного торможения у 100P/100P мышей нормализовался в ответ на престаимulatory при генетической инактивации *Lcn2*. ANOVA с повторяющимися измерениями выявил достоверный эффект генотипа [$F(3,31) = 14.1$; $p < 0.001$], престаимulatory [$F(2,62) = 6.6$; $p < 0.05$] на престаимulatoryное торможение. *** - $p < 0.001$ – по сравнению с +/+ мышами. **В.** Делеция *Lcn2* также восстанавливала дефицит латентного торможения. MANOVA выявил достоверный эффект генотипа [$F(3,47) = 13.5$; $p < 0.001$], пре-экспозиции к тону [$F(1,47) = 62.4$; $p < 0.001$] и их взаимодействия [$F(3,47) = 9.9$; $p < 0.001$]. $N = 6-8$ мышей на группу. *** - $p < 0.001$ – по сравнению с группой животных, получавших пре-экспозицию к тону внутри каждого генотипа.

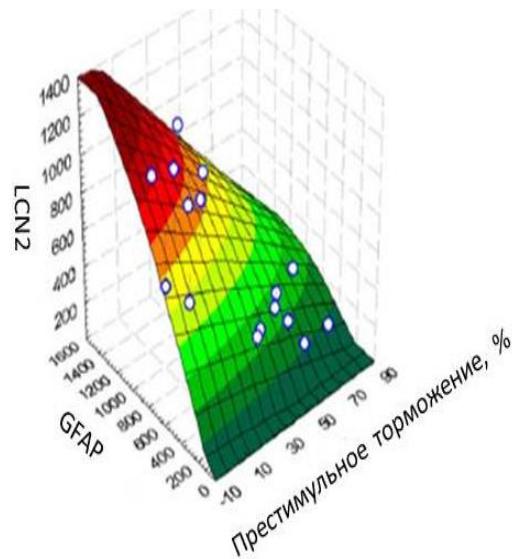


Рис. 43. Уровень *Lcn2* экспрессии коррелирует с GFAP в субвентрикулярной зоне, что в свою очередь также ассоциировано с дефицитом престаимпульного торможения у 100P/100P мышей. 3х-мерная поверхность 2го порядка, иллюстрирующая поверхности средних значений процента престаимпульного торможения, интенсивности *Lcn2* и GFAP. Цветовая кодировка (от зеленого до коричневого) представляет данные по интенсивности GFAP и *Lcn2* (от низкого до высокого значения, соответственно). Коэффициенты Пирсона: $r = -0.73$; $p < 0.001$ – для *Lcn2* и престаимпульного торможения; $r = -0.56$; $p < 0.05$ – для престаимпульного торможения и GFAP и $r = 0.77$; $p < 0.001$ – для

Заключение к Главе 7

Полученные результаты продемонстрировали: 1) нарушение поведения у 100P/100P мышей происходит к 12й недели жизни, но не в возрасте 8 недель; 2) хроническое введение вальпроата до начала проявления шизофреноподобного поведения предотвращало нарушение поведения у 100P/100P мутантных мышей; 3) у 100P/100P мышей наблюдалось больше глиальных клеток в обонятельных луковицах, росто миграционном тракте и субвентрикулярной зоне, но субгранулярной зоне гиппокамп, что корректировалось вальпроатом; 4) генетическая инактивация *Lcn2* корректировала повышенное количество глиальных клеток и шизофреноподобное поведение у 100P/100P мышей. *Lcn2* идентифицирован как новый регулятор пролиферации глиальных клеток в субвентрикулярной зоне головного мозга и поведения, ассоциированного с эндофенотипами шизофрении.

ГЛАВА 8. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Комплексные исследования патогенеза шизофрении за последние десятилетия значительно расширили наше представление о молекулярно-генетических и нейробиологических механизмах данного психиатрического заболевания. В процессе накопления новых знаний совершенствовались теории шизофрении, наиболее полной среди которых стала теория нейроразвития (Lewis and Lewitt, 2002). Теория нейроразвития включает в себя как генетическую предрасположенность, так и патогенные факторы окружающей среды, которые сообща нарушают нейрональное развитие головного мозга в течение нескольких лет, что в результате вызывает проявление первых симптомов шизофрении после полового созревания (Buka and Fan, 1999). Нарушение кортикального нейроразвития, включающего пролиферацию, миграцию, формирование нейрональных путей и миелинизацию, представляет собой ключевой патобиологический процесс шизофрении и соответственно, идентификация надежных биомаркеров нарушения нейроразвития усовершенствует диагностику заболевания и приведет к созданию превентивной медицины. Открытие гена *DISC1* и его интерактома, а также выяснение их функций в процессах клеточной пролиферации, дифференциации и миграции, внесло значительный вклад в теорию нейроразвития шизофрении. Однако, на момент инициации исследований, положивших основу данной диссертации, вопрос о *DISC1* как генетическом факторе риска шизофрении оставался не ясным. Ответ на него, как и разработка надежной диагностики шизофрении на ранней стадии, а также создание эффективных способов профилактики и лечения шизофрении, невозможны без проведения фундаментальных исследований на адекватных биологических моделях.

Для выполнения настоящего исследования были созданы две генетические линии мышей, несущих точечные мутации во 2м экзоне гена *DISC1* – *DISC1-Q31L* (31L/31L) и *DISC1-L100P* (100P/100P). Комплексное исследование мышей двух линий, включая поведенческое фенотипирование, фармакологическую чувствительность к антидепрессантам и антипсихотикам, а также выявление биохимических изменений *DISC1* межбелковых взаимодействий выявило специфичность *DISC1-L100P* мутации, вызывающей шизофреноподобные изменения, в то время как *DISC1-Q31L* мутация предрасполагает к депрессивно-подобному состоянию у мышей. Дальнейшие исследования, включая изменения ДА системы, комбинирование патогенных факторов окружающей среды с генетической предрасположенностью к данному заболеванию, а также поиск новых молекулярных мишеней для ранней диагностики и превенци на 100P/100P генетической линии мышей, верифицировали данную линию как новую генетическую модель шизофрении, подтверждая роль гена *DISC1* в патогенезе данного

заболевания. Полученные уникальные данные в процессе исследований позволили в некоторой степени усовершенствовать дофаминовую и теорию нейроразвития шизофрении, привнеся вклад в область фундаментальной нейронауки.

8.1. Генетическая линия мышей 100P/100P как модель шизофрении

При создании новой биологической модели шизофрении необходимо учитывать основные критерии, включающие этиологию, симптоматику, нейробиологические изменения и прогнозирование заболевания (Willner, 1984).

Этиология: Ген *DISC1* изначально был идентифицирован на 1й хромосоме на месте разрыва при транслокации между 1 и 11 хромосомами у членов Шотландской семьи, страдающих шизофренией, депрессией и биполярным расстройством (Blackwood et al., 2001). Независимые генетические исследования на различных популяциях также выявили ассоциацию между полиморфизмом гена *DISC1* и шизофренией (Moens et al., 2011; Song et al., 2008), биполярным расстройством (Song et al., 2010), депрессией (Carless et al., 2011), и рядом нейropsychиатрических особенностей, включая аутизм, когнитивное старение, тревожность и структурно-функциональные фенотипы нейровизуализации головного мозга (Johnstone et al., 2011; Bradshaw and Porteous., 2012; Carless et al., 2011). Такое разнообразие ментальных заболеваний, связанных с геном *DISC1*, по-видимому, отражают нарушение функциональности *DISC1* интерактома (Lipina and Roder, 2014), и, следовательно, *DISC1* не является узко специфичным геном, связанным только с шизофренией. Действительно, мета-анализ всех известных вариантов гена *DISC1*, включающий 1241 одиночные нуклеотидные полиморфизмы при оценке 11 626 больных шизофренией и 15 237 здоровых людей, не обнаружил универсальный полиморфизм гена *DISC1*, ассоциированный только с шизофренией (Mathieson et al., 2012). Тем не менее, недавнее исследование обнаружило 32 редких мутации в гене *DISC1*, связанных с шизофренией (Crowley et al., 2012), среди которых наиболее примечательным является мутация W160L у больных шизофренией (Thomson et al., 2014), поскольку в наибольшей степени доказывает релевантность исследуемой в данной работе генетической мутации *Disc1-L100P* у мышей, учитывая сходство их локализаций в гене *DISC1* (W160L и L100P) и частичную идентичность структуры гена у человека и мыши.

Шизофрения рассматривается как заболевание сложной этиологии, поскольку в его патогенез критичный вклад вносят взаимодействия между определенными генами и психопатогенными факторами окружающей среды (Lewis и Levitt, 2002). Для дальнейшего доказательства того, что *DISC1-L100P* мутация генетически предрасполагает к развитию шизофреноподобного поведения у мышей, был инициировано исследование, где применяли комбинированное воздействие материнской иммунной активации (МИА;

патогенный фактор среды) на фоне генетической предрасположенности к шизофрении (DISC1-L100P мутация в гетерозиготном состоянии) на ранней стадии эмбриогенеза (постнатальный день 9; ПНД9). Действительно, воздействие МИА на ПНД9 спровоцировало развитие шизофреноподобных эндофенотипов у DISC1-L100P гетерозиготных мышей: дефицит пре-стимульного торможения (Рис. 34А), латентного торможения (Рис. 35), социальной мотивации (Рис. 33Б) и исследовательской активности (Рис. 32Г), а также дефицит пространственного распознавания объектов (Lipina et al 2013с), что подтверждает патогенность DISC1-L100P мутации, имеющей отношение к развитию шизофрении. Следовательно, генетическая модель шизофрении - 100P/100P в полной мере удовлетворяет критерию этиологии.

Симптоматика:

Манифестация позитивных симптомов шизофрении характеризуется галлюцинациями, бредовыми идеями и гиперактивностью, среди которых только нарушение двигательной активности измеримо и на животных (Kirby et al., 2010). Мыши Disc1-L100P генетической линии проявляют устойчивую гиперактивность в условиях ярко освещенной (600 люкс) новой среды (тест «открытое поле») (Рис 2А), причем в течение первых 30 минут с дальнейшей адаптацией двигательной активности (Lipina et al., 2010). Примечательно, что данный эндофенотип стабильно проявляется (Clapcote et al., 2007; Lipina et al., 2010, 2011a,b, 2012, 2014; Su et al., 2014; Walsh et al., 2012). Однако, гиперактивность у 100P/100P мышей не была воспроизведена в условиях более слабого освещения (Arime et al., 2014), где использовалась интенсивность 300 люкс, что, по-видимому, связано с ДА-зависимыми процессами в ответ на новую среду (Hooks and Kalivas, 1995), учитывая повышенную чувствительность ДА системы у 100P/100P линии (Lipina et al., 2010).

Основные негативные симптомы шизофрении заключаются в снижении мотивации, дефиците эмоциональной чувствительности, апатии, и как следствие проявлении дефицита социального поведения. Оценка «поведенческой беспомощности» в тесте «Вынуженного плавания», который отражает мотивацию животного сопротивляться стрессу, не выявила отличий между 100P/100P и мышами дикого типа (Clapcote et al., 2007; Arime et al, 2014; Cui et al 2016). Кроме того, оценка предпочтения к сахарозе - тест, который является показательным для измерения уровня вознаграждения у мышей, также не обнаружила изменений у 100P/100P мышей (Clapcote et al., 2007). Наконец, анализ социальной мотивации и социального распознавания также не обнаружил нарушений у 100P/100P мутантных мышей (Clapcote et al., 2007; Arime et al, 2014; Cui et al 2016), что в целом, исключает симптомы негативной симптоматики у 100P/100P генетической линии.

Когнитивные расстройства при шизофрении довольно разнообразны и включают в себя: снижение уровня и устойчивости внимания; слабая обработка информации; ухудшение рабочей, вербальной и пространственной памяти; дефицит исполнительных функций. Когнитивные симптомы являются основными показателями клинической картины шизофрении (Elvevag and Goldberg 2000; Green 1993), поскольку встречаются при всех подтипах заболевания (Heinrichs and Awad, 1993). Дефицит пре-стимульного торможения реакции вздрагивания, оценивающий сенсорно-моторную фильтрацию информации, является одним из показательных эндофенотипов шизофрении (Braff et al 2001; Swerdlow et al 1994), и степень нарушения пре-стимульного торможения коррелирует с выраженностью симптомов данного заболевания (Swerdlow et al 1994). Нарушение данного эндофенотипа также наблюдалось и у 100P/100P мышей (Рис. 3А; Clapcote et al., 2007; Lipina et al., 2010, 2011a,b, 2012, 2014, Su et al., 2014), воспроизводимое при комбинации трех (Clapcote et al., 2007; Lipina et al., 2010, 2011a,b, 2012, 2014) или четырех (Su et al., 2014) пре-стимулов. Примечательно, что наблюдается прямая зависимость между выраженностью дефицита престимульного торможения и интенсивностью стимулов вздрагивания у 100P/100P мышей (Lipina et al., 2010). Нарушение рабочей памяти при шизофрении отражает неспособность быстрого формирования следа памяти однократных событий и является одним из когнитивных эндофенотипов данного заболевания (Crider et al., 1997). 100P/100P мыши также продемонстрировали дефицит рабочей памяти (Рис. 7А-Б). Для достижения безошибочного выбора в 70% случаев в Т-лабиринте 100P/100P мутантам потребовалось почти в два раза больше времени, чем мышам дикого типа (Рис. 7А) (Clapcote et al., 2007). Наиболее выраженный дефицит рабочей памяти 100P/100P мыши проявили при 5- и 15-секундных интервалах, достигая уровень контрольных животных при 30-секундном интервале (Рис. 7Б). Нарушение рабочей памяти как существенного компонента при распознавании пространства у 100P/100P мышей было также выявлено независимым исследованием при анализе нейрональной активности *in vivo* (Mesbah-Oskui et al., 2015), а также при оценке распознавания смещенных объектов (Cui et al., 2016). Нарушение латентного торможения, свидетельствующее о неспособности организма игнорировать нерелевантные стимулы (Gray et al., 1992), является ключевым эндофенотипом шизофрении, поскольку отражает дефицит внимания и обработки информации, приводящим к когнитивной фрагментации и нарушению сознания (Freedman et al., 1991; Perry et al., 1999; Strauss et al., 1993). Дефицит латентного торможения наблюдается при позитивной симптоматике шизофрении (Gray et al., 1992; Rascle et al., 2001), а также под влиянием амфетамина у здоровых людей (Thornton et al., 1996). Группа мышей линии

100P/100P с предварительной экспозицией к обусловленному тону проявила неспособность игнорировать нерелевантный тон и как следствие, проявила дефицит латентного торможения (Рис. 6). Примечательно, что при этом группа 100P/100P мутантов без экспозиции к тону продемонстрировала память страха, не отличающейся от таковой у мышей дикого типа, что исключает общий когнитивный дефицит. Более того, оценка пространственного обучения и памяти в водном лабиринте Морриса также не выявил когнитивных нарушений у 100P/100P мышей (Рис. 8А-Б). Таким образом, *Disc1-L100P* мутация вызывает когнитивные эндотипы, специфичные для шизофреноподобного поведения, а генетическая модель шизофрении - 100P/100P линия, в целом, удовлетворяет критерию симптоматики.

Нейробиология

Нейроанатомические изменения часто наблюдаются при шизофрении, выявляемые методами нейровизуализации головного мозга (McIntosh et al., 2007; Ross et al., 2006). Анализ взаимодействия полиморфизм гена *DISC1* (замена Ser704Cys) со структурными и функциональными изменениями головного мозга у больных шизофренией выявил достоверное снижение объёма мозга у носителей мутации, включая (пара)гиппокамп и пониженную активацию антериальной коры и дорзолатеральной части префронтальной коры при оценке визуально-пространственного планирования (Ormeier et al., 2015). В соответствии с клиническими данными (Ormeier et al., 2015; Lawrie and Abukmeil, 1998; Wright et al 2000) у мышей 100P/100P линии также наблюдалось выраженное снижение общего объёма мозга на 13% по сравнению с мышами дикого типа (Clarcote et al., 2007). Выявленный пониженный объем мозга, по-видимому, связан с проявлением шизофреноподобных эндотипов у 100P/100P линии, поскольку наблюдалась контракция таких структур головного мозга, как кора, таламус и мозжечок - области мозга, которые вовлечены в патофизиологию шизофрении (Harrison and Weinberger, 2005; Konarski et al., 2005; Ross et al., 2006).

Нейроанатомические нарушения коры и гиппокампа при шизофрении (Ross et al., 2006) сопровождаются абнормальной citoархитектурой коры (Kovalenko et al., 2003), сниженной нейрональной плотностью в поверхностных слоях коры (Akbarian et al., 1993), уменьшенным размером нейронов (Sweet et al., 2003), дефицитом дендритных разветвлений (Young et al., 1998) и плотностью дендритных шипиков (Garey et al., 1998). Недавнее *in vitro* исследование, используя образцы нейрональных предшественников, выделенных из образцов обонятельного эпителия больных шизофренией, идентифицировало дефицит нейрональной миграции, внутриклеточное накопление цАМФ, пониженное содержание *DISC1* в цитоплазме и, напротив, повышенный уровень

DISC1 на сайтах генетической транскрипции (Munoz-Estrada et al., 2015). Морфометрический анализ особенностей нейрональной структуры у 100P/100P мышей идентифицировал дефицит кортикальной нейрональной миграции, снижение числа нейронов, подавление нейрогенеза, а также укорочение дендритных разветвлений кортикальных нейронов, и снижение плотности дендритных шипиков (Lee et al., 2011), что соответствует нейробиологическим изменениям, найденным у шизофреников.

Когнитивный контроль зависит от синхронизации работы нейронов, которая поддерживается сбалансированным функционированием процессов возбуждения и торможения в различных структурах мозга (Miller and Cohen, 2001). ГАМКергические интернейроны обеспечивают ключевой контроль пирамидных нейронов и модуляции синхронизированной осцилляции (Marin, 2012). Дефицит тормозных интернейронов в пост-мортальных образцах головного мозга больных шизофренией наблюдался в ряде клинических исследований, включая также снижение экспрессии гена глутаматдекарбоксилазы-67 (GAD-67) (Gonzalez-Burgos et al., 2010; Blum and Mann, 2002; Lewis et al., 2005). Анализ ГАМК интернейронов у 100P/100P мышей выявил, во-первых, миграционный дефицит данного типа тормозных интернейронов на стадии 14-16 дня эмбриогенеза, во-вторых, у взрослых 100P/100P мутантов было обнаружено снижение GAD-67/ГАМК интернейронов (Lee et al., 2013). Таким образом, нейроанатомические и морфометрические изменения, найденные у 100P/100P мутантных мышей, соответствуют аналогичным параметрам, выявленным у больных шизофренией.

Более того, обнаруженные биохимические изменения, вызванные DISC1-L100P мутацией, в частности нарушения межбелковых взаимодействий между DISC1, PDE4, GSK-3 и D2R (Рис. 21А-В; Рис. 22А-Ж; Рис. 23А-В) (Clapcote et al., 2007; Lipina et al., 2011; Su et al., 2014), также находятся в соответствии с клиническими ассоциативными исследованиями, обнаружившими взаимосвязь между полиморфизмом гена *PDE4* (Millar et al., 2005; Pickard et al., 2007; Numata et al., 2008), гена *GSK-3* (Lovestone et al., 2007; Koros and Dorner-Ciossek, 2007; Beaulieu et al., 2009), *D2R* (Nkam et al., 2017) и шизофренией. Более того, нами впервые было найдено усиление межбелковых взаимодействий между DISC1 и D2R как в стриатуме постмортальных образцов больных шизофренией, так и в стриатуме 100P/100P мышей (Su et al., 2014).

Помимо биохимических изменений, относящихся к DISC1 интерактому, нами также был найден повышенный уровень интерлейкина-6 (ИЛ-6) в ответ на МИА у 100P/100P мышей (Табл. 6), что соответствует повышению уровня ИЛ-6 в плазме крови больных шизофренией (Kalmady et al., 2014). Кроме того, показана взаимосвязь между полиморфизмом гена *ИЛ-6* и пониженным объёмом гиппокампа у шизофреников, что

указывает на вклад данного гена в процессы нейроразвития (Kalmady et al., 2014). Выявленное с помощью транскриптомного анализа повышение экспрессии липокалин-2 (*Lcn-2*) в головном мозге 100P/100P мутантных мышей (Рис. 37Б-Д) также соответствует недавним клиническим данными, где было обнаружено повышение уровня липокалина в плазме больных шизофренией (Wei et al., 2018).

Таким образом, выявленные нейробиологические изменения, вызванные DISC1-L100P мутацией, соответствуют аналогичным отклонениям у больных шизофренией и, следовательно, 100P/100P линия как генетическая модель шизофрении, полностью удовлетворяет критерию нейробиологии.

Прогнозирование заболевания

Для полного соответствия генетической модели шизофрении, также необходимым критерием является эффективность антипсихотиков корректировать шизофреноподобные эндофенотипы. Действительно, антипсихотики - клозапин и галоперидол, но не антидепрессант – бупропион, улучшали дефицит пре-стимульного торможения без влияния на реакцию вздрагивания (Рис. 13), нарушение латентного торможения, не оказывая действие на процессы долговременной памяти (Рис. 14), а также гиперактивность (Рис. 15) у 100P/100P мышей, но не у 31L/31L (Clarpcote et al., 2007), подтверждая предположение о том, что 100P/100P линия соответствует генетической модели шизофрении. Следует отметить, что атипичный антипсихотик - клозапин оказывал более эффективное действие, чем типичный антипсихотик – галоперидол (Рис 21А-Б) (Lipina et al., 2010), что связано с повышенной дофаминергической чувствительностью у 100P/100P мышей.

Следовательно, 100P/100P генетическая модель шизофрении полностью удовлетворяет критериям этиологии, симптоматики, нейробиологии и прогнозирования заболевания.

8.2. Вклад DISC1-L100P интерактома в дофаминергическую теорию шизофрении

Нарушение ДА системы головного мозга играет важную роль в этиологии шизофрении (Howes and Murray, 2014; Lyon et al., 2011) и последние 40 лет ДА теория шизофрении занимала доминирующее место (Snyder, 2006), основываясь на эффектах амфетамина, вызывая психоз, в то время как антипсихотики (блокаторы D2 рецепторов) корректируют психотические симптомы. Последняя версия ДА теории шизофрении объединяет генетические факторы риска и влияние патогенной окружающей среды, которые в результате приводят к нарушению ДА функций и проявлению симптомов шизофрении (Howes and Kapur, 2009).

На момент инициации исследований ДА системы у 100P/100P мутантных мышей роль DISC1 в модулировании функциональности моноаминергических систем мозга оставалась неизвестной. Однако, существовал ряд предпосылок, предполагающих, что DISC1, действительно, модулирует работу ДА системы. Во-первых, DISC1 модулирует активность цАМФ-зависимой фосфодиэстеразы 4го типа (PDE4), опосредуя свое влияние через межбелковое связывание с PDE4 комплексом (Millar et al., 2005; Murdoch et al., 2007), что является существенным элементом при контроле синтеза ДА (Nishi et al., 2008; Yamashita et al., 1997) и фосфорилирования ДА и цАМФ-регулируемого фосфопротеина молекулярной массы 32 кДа (DARPP-32) в стриатуме (Nishi et al., 2008). Во-вторых, DISC1 также взаимодействует с ферментом GSK-3 (Mao et al., 2009; Lipina et al., 2011), который является частью внутриклеточного биохимического каскада при активации D2 рецепторов (Beaulieu et al., 2004) и его активность регулируется психостимулянтами (Svenningsson et al., 2003) и антипсихотиками (Emamian et al., 2004). Более того, временное ингибирование экспрессии DISC1 в процессе нейроразвития у мышей нарушало формирование ДА мезокортикальных нейронов, приводящие к шизофреноподобному поведению у взрослых животных (Niwa et al., 2010). В тоже время, у трансгенной линии мышей с повышенной экспрессией мутантной формы человеческого гена DISC1 (hDISC1), напротив, наблюдалось понижение уровня ДА в коре головного мозга (Ayhan et al., 2011). Нами было обнаружено, что DISC1-L100P мутация ослабляет на 40-80% связывание с PDE4B (Clapcote et al., 2007) и на 25-50% с GSK-3 в головном мозге мутантных мышей (Lipina et al., 2011), следовательно, нарушая функциональность данных ферментов и DISC1 интерактома, в целом. Наконец, поведенческие отклонения у мышей 100P/100P линии: нарушение пре-стимульного торможения, дефицит латентного торможения, нарушение рабочей памяти и гиперактивность, являются ДА-зависимыми эндотипами (Lipina and Roder, 2010; Ralph et al., 2001; Shoblock et al., 2003).

Действительно, биохимические и фармакологические исследования эффектов DISC1-L100P мутации на функциональность ДА системы, в целом, выявили повышение ее чувствительности у мутантных мышей (Рис. 17А-Г, Рис. 18А, Рис. 19Б, Рис. 20) (Lipina et al., 2010). Во-первых, 100P/100P проявили гиперчувствительность в ответ на амфетамин как в тесте «открытое поле», так и при оценке пре-стимульного торможения. Амфетамин в дозе 0.5 мг/кг существенно повышал двигательную активность на 60.7% у DISC1 мутантных мышей, в то время как аналогичное повышение моторики в ответ на низкую дозу амфетамина наблюдалось только на 3.8% у мышей дикого типа (Рис. 17А-Г). Повышенная чувствительность к данной концентрации ДА психостимулятора также наблюдалась у 100P/100P мышей при оценке пре-стимульного торможения: амфетамин

усугублял дефицит пре-стимульного торможения у 100P/100P мышей в ответ на пре-стимулы 69 дБ и 73 дБ, не влияя на мышей дикого типа (Рис. 18А). Следует отметить, что дефицит пре-стимульного торможения не зависит от их пониженной амплитуды реакции вздрагивания (Рис. 18Б), поскольку амфетамин оказывал влияние на пре-стимульное торможение, но не влиял на амплитуду вздрагивания, предполагая их независимые нейробиологические механизмы, что находится в соответствии с литературой (Singer et al., 2009; Paylor and Crawley, 1997). Подобное повышение фармакологической чувствительности к амфетамину наблюдались также и на других DISC1 моделях мышей (Ayhan et al., 2011; Niwa et al., 2010, 2013; Jaaro-Peled et al., 2013; Kuroda et al., 2011; Nakai et al 2014; Vomund et al 2013; Lipina et al 2010; Su et al 2014) и крыс (Trossbach et al., 2016).

Амфетамин вызывает гиперактивность, опосредуемую повышенным высвобождением ДА в синаптическую щель, в частности в стриатуме и прилежащем ядре (Robinson et al., 1986). Амфетамин оказывает своё действие на белки-переносчики моноаминов (ДА, норадреналин и серотонин) и опосредует повышение внеклеточного уровня всех трех моноаминов. Наиболее изучены механизмы действия амфетамина на ДА систему (Kahlig et al., 2005; Sulzer et al., 1995, 2005). Оценка концентрации ДА, норадреналина, серотонина и их метаболитов во фронтальной коре, гиппокампе, стриатуме и прилежащем ядре у 100P/100P мутантов не обнаружила существенных отличий от контроля в базовом состоянии (Табл. 2), исключая возможный дефицит нейроразвития моноаминергических систем мозга. Аналогичные результаты были выявлены при оценке уровня дофамина в отделах головного мозга и у других DISC1 генетических линий мышей (Pogorelov et al., 2012; Niwa et al., 2013; Kuroda et al., 2011; Ayhan et al., 2011). Следовательно, выявленная фармакологическая чувствительность к амфетамину у 100P/100P мышей, возможно, отражает нарушение ДА высвобождения в синапсе. Однако, амфетамин в дозе 0.5 мг/кг повышал внеклеточное содержание ДА в стриатуме в одинаковой степени у экспериментальных животных (Рис. 19А-Б), хотя у 100P/100P мышей наблюдалась тенденция к более продолжительному высвобождению ДА. Отсутствие изменений в выбросе ДА в синаптическую щель в стриатуме при стимуляции амфетамином также наблюдалось и у других DISC1 генетических линий мышей (Niwa et al., 2013; Nakai et al., 2014), однако повышение высвобождения ДА в ответ на амфетамин было отмечено в прилежащем ядре у мышей с повышенной экспрессией человеческого гена DISC1 (Jaaro-Peled et al., 2013; Niwa et al., 2010), что частично находится в соответствии с клиническими результатами, где амфетамин усиливал высвобождение ДА в стриатуме у больных шизофренией и усугублял их психические симптомы (Larueile et al., 1996; Martinez et al., 2003). Повышенное высвобождение ДА в

ответ на амфетамин не всегда сопровождается фармакологической гиперчувствительностью к психомиметику у генетически-модифицированных мышей. Так, например, дефицитные мыши по ДА рецептору 3го типа (*Drd4*), *Gprk6* (G protein-coupled receptor kinase 6); *COMT* (catechol-o-methyltransferase) продемонстрировали ДА суперчувствительность на уровне поведения (Gainetdinov et al., 2003; Huotari et al., 2004; Thomas et al., 2007), в то время как ДА высвобождение в синаптическую щель в нейронах стриатума либо снижалось в ответ на амфетамин (Thomas et al., 2007), либо не изменялось (Gainetdinov et al., 2003; Huotari et al., 2004).

Однако, было предположено, что повышенная фармакологическая чувствительность к психостимулянтам, также связана с повышенной чувствительностью постсинаптических ДА рецепторов, являющихся основной мишенью антипсихотиков (Seeman et al 2006). D2 рецепторы существуют либо в состоянии низкой аффинности к ДА ($D2^{Low}$), либо в состоянии высокой аффинности к ДА ($D2^{High}$), которые являются функциональным физиологическим рецепторным состоянием (George et al., 1985; McDonald et al., 1984). Мы обнаружили повышение $D2^{High}$ рецепторов в стриатуме на 113% (или в 2.1 раза) у 100P/100P мышей (Рис. 20), что соответствует подобному повышению $D2^{High}$ рецепторов у таких линий мышей нокаутных по генам *Drd4*, *Gprk6*, *COMT*, *TH* (тирозингидроксилаза) (Seeman et al., 2005, 2006), а также у трансгенной линии крыс, с повышенной экспрессией укороченной формы человеческого гена *DISC1* (Trossbach et al., 2016). Учитывая повышение фармакологической чувствительности к амфетамину у данных генетических линий животных, сопровождающееся повышением числа $D2^{High}$ рецепторов, был предположен их вклад в механизмы развития ДА суперчувствительности, а плотность $D2^{High}$ рецепторов была предложена в качестве биомаркера шизофрении (Seeman et al., 2006).

D2 рецепторы опосредуют свое внутриклеточное действие через G-белок, который активирует связанные с ним биохимические каскады (Missale et al., 1998; Beaulieu et al., 2009). Так, D2 рецепторы связываются с Gi/Go-белками, контролируя активность аденилат циклазы, циркуляцию фосфатидилинозитола, высвобождение арахидоновой кислоты, внутримембранное выравнивание K^+ и Ca^{2+} каналов и митоген активируемых протеин киназ (Missale et al., 1998). D2 рецепторы также опосредует своё действие независимо от G-белка через β -арестин-2, который способствует формированию межбелкового комплекса с фосфотазой 2A (PP2A), Akt, активируя GSK-3 сигнальные пути (Beaulieu et al., 2009). Функциональность D2 рецепторов, в свою очередь, регулируются межбелковыми взаимодействиями, которые модулируют стабильность рецептора на мембране, его эндоцитоз, эндосомальный трафик, десенситизацию и

чувствительность (Fukunaga and Shioda, 2012; Fuxe et al., 2012). Учитывая, что DISC1 взаимодействует с GSK-3 и PDE4B, а также полученные доказательства, что DISC1 вносит вклад в регуляцию ДА системы, нами было предположено, что DISC1, возможно, является модулятором D2 рецепторов, опосредуя своё действие непосредственно через межбелковые взаимодействия с D2 рецепторами. Действительно, исследование взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами, во-первых, впервые идентифицировало, что DISC1 формирует комплекс с D2 рецепторами, а во-вторых, выявило усиление взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами в стриатуме 100P/100P мутантных мышей почти на 100% от контроля (Рис. 25А-Б) без изменения общего уровня экспрессии D2 рецепторов (Рис. 23В). Более того, аналогичное усиление DISC1 x D2 взаимодействий было обнаружено также в пост-мортальных образцах стриатума больных шизофренией (Su et al., 2014). Молекулярно-биохимическими исследованиями было картировано точное место межбелковых взаимодействий D2 рецепторов и DISC1 – это регион между 211 и 225 аминокислотой 3^{ей} внутриклеточной петли D2 рецепторов, и выявлен новый, DISC1-зависимый механизм регуляции функциональности D2 рецепторов (Su et al., 2014). Формирование комплекса DISC1 x D2 усиливает активацию GSK-3, опосредованную D2 рецепторами и блокирует индуцированную агонистом интернализацию D2 рецепторов. Стимуляция D2 рецепторов приводит к интеграции с β -арестином, что создаёт сбалансированную платформу либо для формирования комплекса с DISC1 и β -арестин-PP2A-Akt, либо для формирования β -арестин-клатрин-AP2 межбелковых взаимодействий при отсутствии DISC1, что приводит к интернализации D2 рецепторов в нормальном физиологическом состоянии (Su et al., 2014). При повышенной стимуляции D2 рецепторов происходит активация GSK-3, опосредованная усиленным взаимодействием с DISC1- β -арестин-PP2A-Akt, что приводит к снижению интернализации D2 рецепторов, и в результате положительной обратной связи вызывает психопатологическое состояние (Рис.44). Следовательно, было предположено, что коррективная патологически усиленных DISC1 x D2 взаимодействий у 100P/100P линии мышей с помощью синтезированного TAT-D2-пептида, селективно размыкающего данные межбелковые взаимодействия (Su et al., 2014), нормализует их шизофреноподобное поведение. Действительно, TAT-D2-пептид нормализовал гиперактивность и дефицит пре-стимульного торможения у 100P/100P линии мышей (Рис. 31А-Б) (Su et al., 2014), что указывает на его антипсихотическое действие.

Таким образом, многочисленные данные, как собственных исследований (Lipina et al., 2010, 2011, 2013b; Su et al 2014), так и литературы (Pogorelov et al., 2012; Niwa et al., 2010, 2013; Kuroda et al., 2011; Ayhan et al 2011; Jaaro-Peled et al 2013; Nakai et al 2014;

Trossbach et al 2016), подтверждают важный вклад DISC1 и его интерактома (D2R, GSK-3) в регуляцию ДА функций головного мозга (обзор Dahoun et al., 2017).

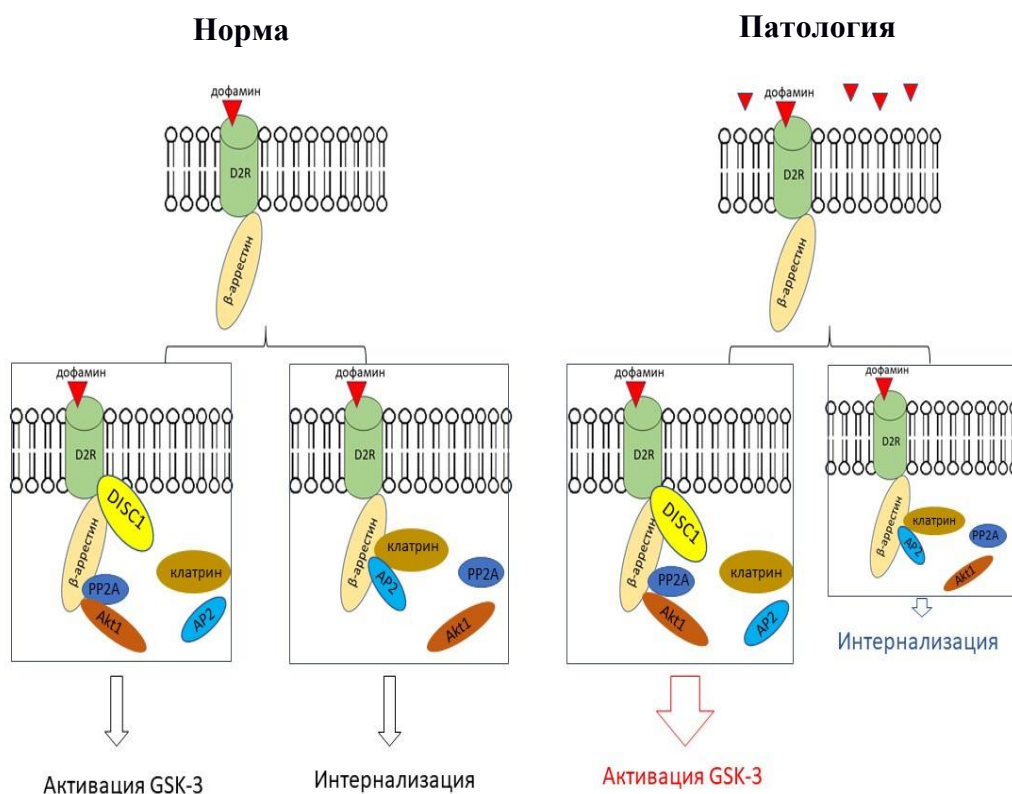


Рис. 44. Схема взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами. Стимуляция D2 рецепторов приводит к взаимодействию с β -аррестином, что создаёт сбалансированную молекулярную основу либо для формирования комплекса с DISC1 и β -аррестин-PP2A-Akt, или β -аррестин-клатрин-AP2 комплекса в отсутствии DISC1, что в норме вызывает интернализацию D2 рецепторов (Su, Li, Chen, Lipina et al., 2014). При патологически повышенной стимуляции D2 рецепторов активируется GSK-3, опосредованная усиленным взаимодействием с DISC1- β -аррестин-PP2A-Akt, что в результате приводит к снижению интернализации D2 рецепторов и вызывает психопатологическое состояние.

8.3. Вклад DISC1-L100P мутации в теорию нейроразвития шизофрении

Согласно теории нейроразвития шизофрении патогенные процессы возникают гораздо раньше, чем клиническое проявление симптомов (Rabe-Jablonska, 2005). Так, долговременные исследования, используя магнитно-резонансную томографию, выявили прогрессирующие структурные изменения головного мозга еще до начала первого эпизода психоза (Lawrie et al 2008). Однако, до сих пор остаётся неизвестным, если патологическое нейроразвитие возможно изменить, предотвратив структурные нарушения и наступление клинических симптомов. В данном направлении уже достигнуты определенные успехи на биологических моделях шизофрении, используя, например, миноциклин на модели материнской иммунной активации (Giovanoli et al., 2016), омега-3 на кетаминовой модели шизофрении (Zugno et al., 2015) или соли лития при хроническом психосоциальном стрессе (Brozka et al., 2016). Несмотря на то, что DISC1 выполняет важную функцию в процессах нейроразвития, включая нейрогенез (Enomoto et al., 2009; Mao et al., 2009), нейрональную миграцию, созревание дендритов и синаптогенеза (Kim et al., 2009; Lee et al., 2011, 2013), поведение DISC1 генетических линий мышей до сих пор оценивалось только у взрослых особей (Lipina and Roder, 2014). Сравнительный анализ двигательной активности, престаимпульного торможения и латентного торможения у 100P/100P мышей в возрасте 8 недель (подростковый период) и 12 недель (взрослый период), действительно, выявил динамические изменения поведения. Так, в подростковый период мутантные мыши линии 100P/100P не отличались от мышей дикого типа по двигательной активности, амплитуде вздрагивания и латентному торможению (Рис. 37А, В, Г), однако, уже проявляли незначительный дефицит пре-стимульного торможения (Рис. 37Б). Спустя месяц у 100P/100P мышей наблюдалась гиперактивность, усугубление дефицита пре-стимульного торможения и латентного торможения (Рис. 37А-Г), что указывает на отставленное в развитии появление шизофреноподобных эндофенотипов, что соответствует подростковой манифестации шизофрении в клинике. Данный феномен нами впервые был продемонстрирован на генетической модели шизофрении (Lipina et al., 2012). Начало появления шизофреноподобного поведения также в подростковый период был отмечен у крыс на фоне материнской иммунной активации (Zuckerman and Weiner, 2003), и хроническая администрация рисперидона (антипсихотика) до появления отклонений предотвращала структурные нарушения головного мозга и поведенческий репертуар (Piontkewitz et al., 2011). Следовательно, 100P/100P генетическая модель шизофрении является уникальной, поскольку предоставляет возможность для исследований нейробиологических механизмов патологического нейроразвития, выявления новых молекулярных биомаркеров и мишеней для превентивной терапии

шизофрении. Хроническое введение вальпроата до наступления шизофреноподобного поведения у 100P/100P мышей предотвращало развитие у них патологического состояния (Рис. 38А-Г), подтверждая его позитивное действие на других моделях шизофрении (Tremolizzo et al., 2005; Flood et al., 2009; Umedo et al., 2006). Более того, действие вальпроата сохранялось спустя 3 недели после прекращения его введения (Рис. 38Г-Е), предполагая, что данное фармакологическое воздействие оказывало эффект на нейроразвитие.

Геномный анализ идентифицировал значительный эффект DISC1-L100P мутации на экспрессию генов в гиппокампе и стволе головного мозга, в то время как вальпроат оказывал минимальное действие на экспрессию генов в гиппокампе и стриатуме, что соответствует отсутствию эффектов вальпроата на поведение контрольных мышей. В соответствии с литературой (Monti et al., 2009), вальпроат изменял экспрессию транскрипционных факторов (*Egr2* и *Fosb*), генов, вовлечённых в эпигенетическую регуляцию (*Hist1h1c*, *Hist1h2be*) и гена нейрональной проводимости (*Clcn2*). Вальпроат оказывал широкий спектр на транскрипцию генов у 100P/100P мутантных мышей, корректируя экспрессию 21.3% генов в гиппокампе (Приложение). Более того, было выявлено конвергентное действие DISC1-L100P мутации и вальпроата на экспрессию 14 генов, из которых 5 генов ассоциированы с шизофренией (Приложение).

Глиальные клетки выполняют важную роль для функционирования синапсов, их созревания и, следовательно, являются клеточными мишенями для терапии ментальных заболеваний (Bolton et al., 2009). Нами впервые была продемонстрирована ассоциация между шизофреноподобным поведением у 100P/100P мышей с повышенной экспрессией гена липокалин 2 (*Lcn2*) и количеством GFAP⁺ глиальных клеток в субвентрикулярной зоне головного мозга (Рис. 40В-Г) (Lipina et al., 2012). Оказалось, что фармакологическое (Рис. 40А-Д) и генетическое (Рис. 41В-Г) ингибирование *Lcn2* корректировало повышенное количество GFAP⁺ астроцитарных клеток у 100P/100P мутантных мышей. Липокалин-2 является гликопротеином, изначально выделенным из нейтрофилов (Kjeldsen et al., 1993), который переносит жирные кислоты и молекулы железа, вызывает апоптоз, регулирует врожденный иммунитет (Rodvold et al., 2012), являясь также фактором неоплазии (Rodvold et al., 2012). Точный молекулярный механизм взаимодействия между DISC1 и *Lcn2* остаётся неизвестным, но, по-видимому, связан с Rho-ROCK внутриклеточной системой, через которую *Lcn2* опосредует свои эффекты на функциональность астроцитов (Lee et al., 2009). DISC1-L100P мутация, в свою очередь, снижала экспрессию трех генов, связанных с Rho-ROCK (*Cde42ep2*; *Arhgap24*; *Rock2*) (Приложение). Функциональная роль *Lcn2* в головном мозге остается неизвестна, однако

учитывая его совместную локализацию с GFAP, маркером глиальных клеток (астроцитов), а также его повышенную экспрессию в ответ на стимулятор иммунной системы (липополисахарид) (Choi et al., 2011), было предположено, что *Lcn2* является новым глатрансмиттером (Lee et al., 2009). Примечательно, что выявлена ассоциация между повышенным уровнем *Lcn2* в плазме крови и слабыми когнитивными нарушениями у людей (Choi et al., 2011). Недавнее клиническое исследование выявило повышенную экспрессию *Lcn2*, а также интерферона- γ в плазме крови больных шизофренией (Wei et al., 2018), подтверждая трансляционность 100P/100P генетической модели шизофрении.

Таким образом, полученные нами данные: отставленное проявление шизофреноподобного поведения у 100P/100P линии мышей; повышенная у них пролиферация глиальных клеток, а также превентивная эффективность фармакологической и генетической ингибиции *Lcn2*, указывают на существенный вклад DISC1 и его интерактома в процессы нейроразвития. Более того, данная часть исследования подтверждает возможность ранней превенции шизофрении, корректируя психопатологические процессы на молекулярно-клеточном уровнях еще до появления шизофреноподобного поведения.

Идентификация взаимосвязи между *Lcn2*, повышенным количеством глиальных клеток и дефицитом сенсорно-моторной фильтрации у 100P/100P мышей указывает на значительный вклад иммунной системы в патогенез шизофреноподобного поведения у данной генетической линии. Действительно, показано, что патогенные факторы окружающей среды провоцируют психозы на фоне генетической предрасположенности, опосредуя своё действие через нейро-иммунные механизмы (O'Tuathaigh et al., 2015; van Os et al., 2010). Влияние стрессоров особенно критично на ранних стадиях нейроразвития, и в основе общего патофизиологического механизма их воздействия является активация материнской иммунной системы (Brown, 2011; Brown and Derkits, 2010). Так, например, пренатальная инфекция бактериями, вызывающими пилонефрит, повышала в пять раз риск шизофрении у детей среди членов семьи с историей психозов (Clarke et al., 2009). Следовательно, нами было предположено, что поскольку DISC1-L100P мутация вызывает шизофреноподобное поведение у гомозиготных мышей, то воздействие МИА на 100P/+ гетерозиготных мышей в эмбриогенезе нарушит их нейроразвитие и спровоцирует шизофреноподобное поведение. Действительно, было обнаружено, что МИА имела более значительный эффект на социальную мотивацию, пре-стимульное торможение и латентное торможение у 100P/+ гетерозиготных мышей по сравнению с мышами дикого типа (Рис. 33А; Рис. 34А; Рис. 35) и 31L/+ мышей (Lipina et al., 2013c). Повышенный уровень ИЛ-6 в головном мозге эмбрионов 100P/+, а также способность антител к ИЛ-6

предотвращать развитие шизофреноподобного поведения у 100P⁺ х МИА мышей, подтверждает существенный вклад ИЛ-6 в нейроглиальные механизмы действия МИА на стадии патологического нейроразвития. В целом, полученные данные, подтверждают патогенность DISC1-L100P мутации в отношении шизофрении, а также указывают на специфичность 100P⁺ х МИА взаимодействий, что находится в соответствии с тем, что МИА у людей является фактором риска шизофрении, но не депрессии. Подобные ген х среда патогенные взаимодействия, вызывающие шизофреноподобное поведение у мышей, также были выявлены для других генетических мутаций, включая DN-DISC1 (Ibi et al., 2010), hmDISC1 (Abazyan et al., 2010), Nurr1^{+/-} (Vuillermot et al., 2012), Tsc2⁺ (Ehninger et al., 2012), подтверждая полигенность шизофрении. Примечательно, что poly I:C в дозе 5 мг/кг при воздействии с DISC1-L100P⁺ мутацией не приводит к рождению потомства, в то время как та же доза агента МИА не влияла на число помётов и число потомков у мышей дикого типа и 31L⁺. По-видимому, МИА взаимодействует еще и с материнским генотипом 100P⁺ дополнительно к генотипу эмбриона, поскольку для получения гибридных МИА х 100P⁺ животных использовали мутантных самок, скрещивая с самцами дикого типа. Тем не менее, повышенный уровень ИЛ-6 в ответ на poly I:C был выявлен у 9-дневных МИА х 100P⁺ эмбрионов, особенно в дозе 5 мг/кг (Табл. 6), отражая у них более выраженную воспалительную реакцию, что приводит к отсутствию рожденного потомства в данной группе. Так, повышенный уровень ИЛ-6 вовлечён в бесплодие, рецидивирующие выкидыши, преэклампсии и преждевременные роды у людей (Prins et al., 2012). Возможным механизмом может быть предположено ингибирование продукции CD4⁺ Т-регуляторных клеток в ответ на повышенный уровень ИЛ-6 (Bettelli et al., 2006), которые нарушают устойчивость иммунной системы при беременности. Прекращение беременности, вызванное иммунологическими процессами, отмечаются у людей (Salmon et al., 2004), подтверждая полученные наблюдения на МИА х 100P⁺ мышах. Помимо патогенного эффекта МИА на 100P⁺ гетерозиготных мышей, было обнаружено, что polyI:C в дозе 5 мг/кг вызывает шизофреноподобное поведение у мышей дикого типа, подтверждая литературные данные (Meyer et al., 2005; Vuillermot et al., 2010). Также было выявлено отставленное проявление дефицита пре-стимульного торможения у WT мышей (Lipina et al., 2013c), подтверждая теорию нейроразвития шизофрении и предполагая, что данная модель шизофрении может быть полезна при тестировании превентивных средств шизофрении (Li et al., 2010; Piontkewitz et al., 2012). Примечательно, что низкая доза polyI:C не влияла на поведение WT мышей, за исключением, латентного торможения, что находится в соответствии с литературными данными (Meyer et al., 2005; Smith et al., 2007).

Молекулярные механизмы, вовлечённые во взаимодействие 100P⁺ мутации с МИА, пока остаются неисследованы. Однако, учитывая нарушения межбелковых взаимодействий DISC1 интерактома, вызванные 100P/100P мутацией, можно предположить, что повышенная активность GSK-3, который является ключевым регулятором иммунной системы (Wang et al., 2011), нарушает иммунный ответ у 100P/100P мышей, включая повышенный уровень ИЛ-6, что в результате приводит к повышенной реактивности глиальных клеток (Eskes et al., 2012). Действительно, нами было выявлено повышенное количество астроцитарных клеток у 100P/100P мутантов, где липокалин-2 играет важную роль. По-видимому, Lcn2 также вовлечён в молекулярно-клеточные механизмы шизофрении на гибридной модели 100P⁺ x МИА, поскольку его повышенная экспрессия отмечалась в ответ на липополисахарид - LPS (аналог poly I:C) (Lee et al., 2009). Действительно, МИА у грызунов (Borrell et al., 2002; Fatemi et al., 2002, 2004; Samuelsson et al., 2006) повышала число и активацию астроцитов и микроглии в головном мозге, которые являются основным источником продуцирования цитокинов в центральной нервной системе (Benveniste, 1998), вовлечённые в формирование дофаминергической (Tai et al., 2007) и глутаматергической (Wolosker, 2011) нейротрансмиттерных систем.

Таким образом, детекция новых терапевтических мишеней превентивной терапии на генетической линии 100P/100P (Lipina et al., 2012), так и изучение ген x среда взаимодействий (Lipina et al., 2013c), предполагают вклад DISC1-L100P и его интерактома в процессы нейроразвития, нарушение которых приводит к проявлению шизофреноподобного поведения у мышей. Фармакологическое (вальпроат) или биохимическое (антитела к ИЛ-6) вмешательство на ранних стадиях развития корректировало молекулярно-клеточные нарушения и предотвращало проявление шизофреноподобных эндотипов у исследуемой генетической линии. Независимые исследования морфометрических особенностей нейрональной структуры 100P/100P линии (Lee et al., 2011, 2013) продемонстрировали дефицит миграции кортикальных нейронов, в том числе и тормозных интернейронов на стадии 14-16 дня эмбриогенеза, дополнительно подтверждая роль DISC1-L100P в процессах нейроразвития, ассоциированных с шизофреноподобным поведением.

8.4. Вклад DISC1-L100P интерактома в разработку биомаркеров шизофрении и создание антипсихотиков нового поколения

Поиск надёжных и доступных биомаркеров шизофрении является одной из актуальных задач в области психиатрии, сложность которой связана с ограничением забора материала центральной нервной системы у пациентов. В настоящее время

материал для исследования включает забор пост-мортальных образцов головного мозга, спинномозговую жидкость, кровь, фибробласты, и генетически модифицированные клетки, например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Дополнительно к данным видам биоматериала недавно для поиска биомаркеров шизофрении также добавили обонятельный эпителий, содержащий зрелые обонятельные нейроны и нейрональные клетки-предшественники (Lavoie et al., 2017).

Биомодели шизофрении предоставляют уникальную возможность идентифицировать новые молекулярные мишени, используя различные виды биоматериала экспериментальных животных, для дальнейшего внедрения полученного знания в клинические исследования. Комплексное исследование биохимических особенностей генетической линии 100P/100P выявило ряд нарушений (Таблица 6), включая показатели повышенной чувствительности ДА системы, нарушение межбелковых взаимодействия с GSK-3, PDE4B, D2R, а также повышение экспрессии Lcn2 и повышенный уровень ИЛ-6 в ответ на МИА.

Повышенная фармакологическая чувствительность к амфетамину, выявленная у 100P/100P мышей, имеет параллели с клиническими исследованиями, поскольку больные шизофренией чувствительны к психомиметикам (Gray et al., 1997; Braff et al., 2001). Однако, амфетамин нарушал пре-стимульное торможение также и у здоровых людей с повышенной исследовательской активностью (Hutchison et al., 1999), исключая данный показатель в качестве специфичного биомаркера шизофрении. Повышение пропорции высокочувствительных дофаминовых рецепторов D2 ($D2R^{high}$) было предложено в качестве биомаркера шизофрении (Seeman et al., 2006), однако, для внедрения данного показателя в клинические исследования необходима разработка более специфичного лиганда, связывающегося с $D2R^{high}$ (Seeman, 2012). Кроме того, данный показатель имеет ограничения, поскольку может быть только оценен на пост-мортальных образцах мозга больных шизофренией. Оценка межбелковых взаимодействий DISC1-L100P выявила снижение на 40-50% с GSK-3, на 40-80% с PDE4B (Lipina et al., 2012), а также усиление взаимодействий с D2 рецепторами на ~ 100% (Su et al., 2014). Нарушения DISC1 интерактома, вызванные 100P/100P мутацией, отражают специфичные биохимические процессы, приводящие к шизофреноподобному поведению у мышей. Действительно, 31L/31L мутация в данном гене, ассоциированная с депрессивно-подобным поведением, почти полностью разрушала взаимодействия DISC1-Q31L с GSK-3 (до 90%), снижая взаимодействия с PDE4B всего на 25% (Lipina et al., 2012), и не нарушая формирование комплекса с D2 рецепторами (Su et al., 2014). Важно отметить, что аналогичное усиление биохимической аффинности межбелковых взаимодействий DISC1 с D2 рецепторами были

выявлены также в стриатуме пост-мортальных образцов головного мозга больных шизофренией (Su et al., 2014). Следовательно, по-видимому, именно DISC1 межбелковые взаимодействия более точно отражают психопатологические нарушения, чем, например, ферментативная активность GSK-3, оцененная по уровню фосфорилирования, поскольку нарушенная функциональность GSK-3 наблюдалась при шизофрении (Lovestone et al., 2007), болезни Альцгеймера (Maqbool et al., 2016) и биполярном расстройстве (Muneer, 2017).

Дополнительно, была идентифицирована повышенная экспрессия *Lcn2*, коррелирующая с дефицитом пре-стимульного торможения у 100P/100P мышей, а также повышенный уровень ИЛ-6 в ответ на МИА. Примечательно, что аналогичное повышение экспрессия *Lcn2* недавно было выявлено в плазме крови у больных шизофренией (Wei et al., 2018), что предполагает *Lcn2* использовать в качестве биомаркера шизофрении. Однако, необходимы дополнительные клинические исследования, поскольку повышенная экспрессия *Lcn2* в плазме крови также наблюдалась при слабых когнитивных нарушениях, предшествующих развитию болезни Альцгеймера (Choi et al., 2011). Была выявлена ассоциация *Lcn2* с амилоидом- β в плазме крови и деменцией при синдроме Дауна (Naude et al., 2015), депрессией и сердечно-сосудистых нарушениях (Gouweleeuw et al., 2015). Также повышенная экспрессия *Lcn2* отмечается и при глиомах (Liu et al., 2011). Наконец, была обнаружена повышенная реактивность ИЛ-6 в ответ на МИА у МИА x 100P/+ эмбрионов. Недавнее клиническое исследование обнаружило достоверную взаимосвязь между повышенным уровнем растворимой формы рецепторов к ИЛ-6 и шизофренией (Hartwig et al., 2017), что, возможно, определяет предрасположенность к инфекционным заболеваниям на ранней стадии нейроразвития и как следствие, развитию данного психического расстройства. Однако, учитывая, что повышение ИЛ-6 отмечается у взрослых пациентов при ряде заболеваний, включая, например, расстройства настроения, можно предположить, что данный показатель вряд ли является селективным индексом шизофрении, а комплексная оценка цитокинов на стадии эмбриогенеза у людей имеет свои ограничения.

Таким образом, на основе анализа биохимических изменений, выявленных на 100P/100P модели шизофрении, DISC1 межбелковые взаимодействия можно рассматривать в качестве надёжных биомаркеров шизофрении. Методы современного биохимического анализа постоянно совершенствуются, включая, например, клеточные матриксы-скаффолды (Мясоедова и др., 2016), и возможно, в ближайшее время будут включать оценку внутриклеточных сигнальных путей на уровне межбелковых взаимодействий (Café-Mendes et al., 2014).

Используемые в настоящее время антипсихотики, кроме основного клинического действия, вызывают побочные эффекты, включая экстрапирамидный синдром, повышение веса, дискинезию, диабет и нарушение функционирования половой системы (Leucht et al., 2009). Более того, около 60% пациентов не отвечают на применяемую антипсихотическую терапию и развивают терапевтическую резистентность. Кроме того, текущие антипсихотики малоэффективны при коррекции когнитивных симптомов шизофрении (Barak and Weiner, 2011). Следовательно, разработка антипсихотиков нового поколения является актуальной задачей в области нейропсихофармакологии.

Клиническая эффективность антипсихотиков коррелирует с их связывающей способностью с D2 рецепторами (Seeman et al., 1976). Для создания антипсихотиков, не вызывающих побочных эффектов, необходимо глубокое понимание сигнальных путей D2 рецепторов для идентификации новых терапевтических мишеней. Идентификация взаимодействия DISC1 с D2 рецепторами (Su et al., 2014) указывает на то, что DISC1 и его интерактом являются важными молекулярными регуляторами D2 рецепторов, а нарушение DISC1 интерактома на 100P/100P модели шизофрении предполагает, что его коррекция, возможно, окажет антипсихотический эффект. Действительно, ингибирование ферментативной активности белков, относящихся к DISC1 интерактому, вызывало антипсихотические эффекты, включая GSK-3 (Lipina et al., 2011) и PDE4B (Clapcote et al., 2007; Lipina et al., 2011). Так, фармакологическая блокада PDE4B ролипрамом улучшало дефицит пре-стимульного торможения у 100P/100P мышей. Однако, несмотря на антипсихотическую эффективность, фармакологический ингибитор PDE4B обладает рядом побочных действий (н-р, вызывает рвоту), в связи с чем клинические исследования блокаторов PDE4B были прекращены (Giembsics et al., 2005). Фармакологическое (TDZD-8) и генетическое ингибирование повышенной ферментативной активности GSK-3 у 100P/100P линии мышей также вызвало антипсихотический эффект, нормализуя их шизофреноподобное поведение. Кроме того, GSK-3 ингибитор – VP3.36, проявляя антипсихотические свойства на моделях шизофрении, также обладает ноотропными свойствами (Lipina et al., 2016), представляя интерес для дальнейшего внедрения в клинические испытания, поскольку текущие антипсихотики слабо эффективны для коррекции когнитивных симптомов шизофрении (Barak and Weiner, 2011). Относительно недавно GSK-3 ингибиторы (LY2090314, tideglusib) были одобрены для клинических испытаний с целью определения фармако-кинетических свойств (Gray et al., 2015), а также эффективности на пациентах с болезнью Альцгеймера (Lovestone et al., 2015). Поскольку PDE4B и GSK-3 взаимодействуют с DISC1 в частично перекрывающихся районах DISC1 (190-230 aa – PDE4B и 193-236 aa – GSK-3) (Lipina and Roder, 2014), их взаимное действие

зависит от связывания с DISC1. Действительно, одновременное введение ролипрама и TDZD-8 в подпороговых дозах вызывало синергетический эффект на дефицит престаимпульного торможения и гиперактивность у 100P/100P мышей (Lipina et al., 2011), демонстрируя функциональные взаимодействия между GSK-3 и PDE4B в DISC1-зависимой манере. Более того, дуальное ингибирование GSK-3 и PDE7 фармакологическим соединением VP1.15 также оказывало антипсихотическое действие наряду с ноотропным эффектом (Lipina et al., 2012), желаемое свойство антипсихотика нового поколения. Наконец, недавно выявленное усиление взаимодействий между DISC1 и D2 рецепторами, послужило причиной для создания пептида, селективно размыкающего усиленные DISC1 x D2 межбелковые взаимодействия (TAT-D2per) при взаимодействии на 3ю внутриклеточную петлю D2 рецептора в регионе с 211 по 225 aa (Su et al., 2014). Введение TAT-D2per оказывало антипсихотические свойства на фармакологических и генетической моделях шизофрении без побочных эффектов (Su et al., 2014). Дальнейший скрининг данного пептида будет включать оценку его терапевтических и превентивных свойств на разнообразных моделях шизофрении, что позволит инициировать трансляцию TAT-D2per в клинические испытания. Следовательно, проведённые исследования DISC1 интерактома предлагают оценку DISC1 взаимодействий с D2, GSK-3 и PDE4 как перспективные мишени для диагностики и создания антипсихотиков нового поколения.

Таблица 7. Потенциал биохимических показателей, выявленных на модели 100P/100P, для создания биомаркеров шизофрении и антипсихотиков нового поколения

Показатель	Биомаркер	Антипсихотик
<i>Дофаминергическая система</i>		
↑ D2 ^{high}	Необходима разработка более специфичного лиганда, ограничение в заборе материала	D2 рецепторы является основной «мишенью» действующих антипсихотиков
<i>Межбелковые взаимодействия с DISC1-L100P</i>		
↓ PDE4B на 40-80%	DISC1 x PDE4B	PDE4B ингибиторы*
↓ GSK-3 на 40-50%	DISC1 x GSK-3	GSK-3 ингибиторы**
↑ D2R на ~ 100%	DISC1 x D2R	TAT-D2пер***
<i>Другое</i>		
↑ Lcn2	Необходимы дополнительные исследования	
↑ ИЛ-6 в ответ на МИА (эмбрионы)	Не специфичен, Ограничение в заборе материала	Антитела к ИЛ-6****

*Клинические испытания с фармакологическим PDE4B ингибитором прекращены из-за его побочных эффектов. **Фармакологические ингибиторы GSK-3 введены в фазу 1 и 2 клинических испытаний для лечения больных расстройством Альцгеймера. *** Для введения экспериментального TAT-D2пер пептида в клинические испытания необходимы дополнительные доклинические исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное комплексное исследование доказало вклад 2го экзона гена *DISC1* в патогенез шизофреноподобного состояния на впервые созданной генетической линии мышей *DISC1-L100P* (100P/100P). В результате точечной мутации во 2м экзоне (*L100P*) нарушаются функциональные взаимодействия *DISC1* с *PDE4B*, *GSK-3* и *D2* рецепторами, что в результате приводит к повышенной чувствительности дофаминергической системы головного мозга. В частности, пониженное межбелковое взаимодействие между *DISC1-L100P*, *PDE4B* и *GSK-3* повышает ферментативную активность *GSK-3*, что нарушает формирование межбелкового комплекса *D2* рецепторов с клатрином, *AP2*, β -арестином, *Akt1*, и усиливает взаимодействия *D2* рецепторов с *DISC1*, в результате чего снижается интернализация *D2* рецепторов, приводящая к повышенной чувствительности ДА системы мозга и патологическому поведению у 100P/100P мышей. Аналогичное усиление взаимодействий между *DISC1* и *D2* рецепторами было обнаружено также и у больных шизофренией. Селективное размыкание усиленных взаимодействий между *DISC1* и *D2* рецепторами с помощью *TAT-D2per* оказывало антипсихотический эффект на шизофреноподобное поведение 100P/100P мышей. Дополнительно, фармакологические блокаторы *GSK-3* и *PDE4B* также оказывали антипсихотическое действие на 100P/100P биомодель шизофрении. Следовательно, исследования *DISC1* и его интерактома представляют перспективное направление как с целью фундаментального понимания молекулярных механизмов шизофрении, так и для создания новых биомаркеров шизофрении и антипсихотиков, что в дальнейшем может быть транслировано в область клинических исследований.

Поиск надежных биомаркеров шизофрении для ранней диагностики и разработка превентивной терапии данного заболевания является актуальной задачей в области психофармакологии. Проявлению шизофреноподобного поведения у взрослых 100P/100P мышей предшествуют молекулярно-клеточные изменения на более ранних этапах нейроразвития. Прогресс симптомов заболевания с возрастом у 100P/100P происходит на фоне повышенной генетической экспрессии *Lcn2* в головном мозге, сопровождающийся активацией пролиферации астроцитов в области росто-мигрантного тракта и обонятельных луковиц, негативно коррелирующих с сенсорно-моторной фильтрацией - классическим эндотипом шизофрении. Превентивное введение вальпроата до манифестации шизофреноподобного поведения подавляло экспрессию *Lcn2*, количество глиальных клеток и как следствие, нормализовало шизофреноподобное поведение на биомодели 100P/100P, свидетельствуя о пластичности нервной системы. Наконец, создание гибридной модели шизофрении, сочетая патогенный фактор окружающей среды

– МИА, и генетическую предрасположенность – 100P/⁺, позволило доказать вклад ИЛ-6 в нейроглиальные взаимодействия, вовлечённые в патологические механизмы шизофрении.

Таким образом, комплексное исследование на 100P/100P генетической линии мышей позволяет заключить, что данная линия мышей является перспективной моделью шизофрении, исследования на которой позволят выявить новые молекулярно-клеточные и нейробиологические механизмы данного заболевания, что приведет к идентификации новых биомаркеров шизофрении, а также мишеней для превентивных и терапевтических воздействий. Результаты, полученные в ходе выполнения данной диссертационной работы, позволили ответить на поставленные ранее вопросы (Рис. 45).

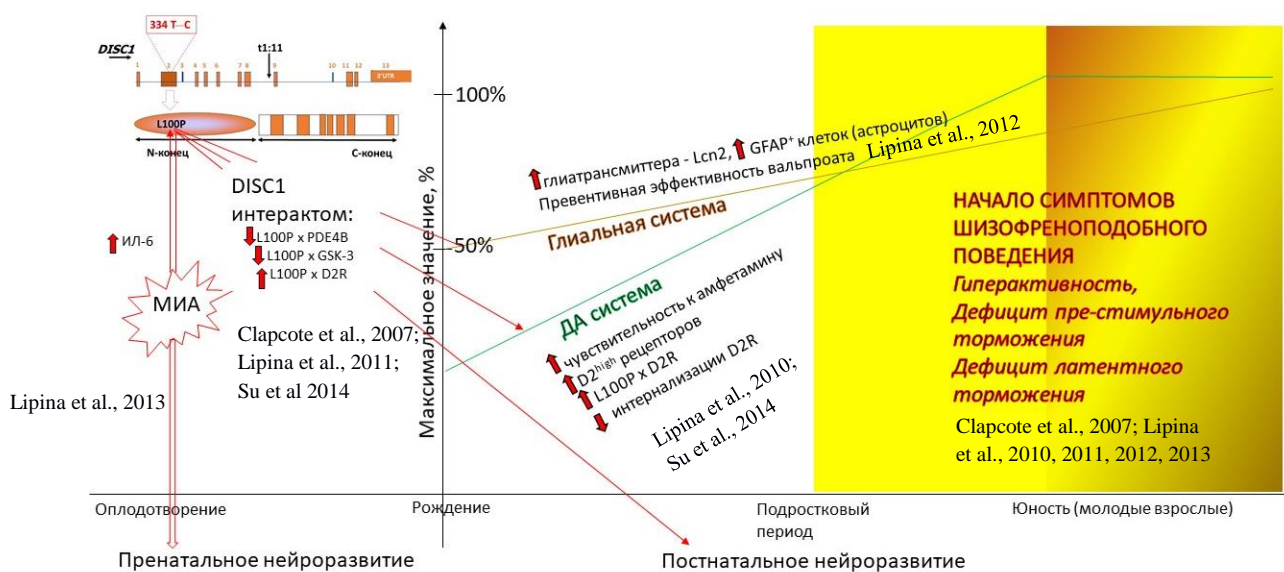


Рис. 45. Схема, иллюстрирующая основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационной работы.

ВЫВОДЫ

1. Генетическая линия мышей 100P/100P с точечной мутацией во 2м экзоне гена *DISC1*, соответствует основным критериям экспериментальной модели шизофрении: этиологии, сходству симптомов; нейробиологическим изменениям и специфическому терапевтическому ответу на антипсихотические препараты.
2. Точечная мутация 100P/100P нарушает межбелковые взаимодействия *DISC1* с дофаминовыми D2 рецепторами, что приводит к гиперактивации дофаминергической системы головного мозга, проявляющейся в повышенной фармакологической чувствительности к амфетамину, увеличении количества высокочувствительных дофаминовых D2 рецепторов, что приводит к манифестации шизофреноподобного поведения у 100P/100P линии мышей.
3. В основе биохимических механизмов шизофреноподобного поведения лежит нарушение межбелковых взаимодействий *DISC1-L100P* протеина с GSK-3, PDE4B и D2 рецепторами. Коррекция повышенной активности GSK-3, PDE4B, а также усиленных межбелковых взаимодействий между *DISC1* и D2 рецепторами, оказывает антипсихотический эффект на шизофреноподобное поведение 100P/100P мутантных мышей.
4. Патогенный фактор окружающей среды, материнская иммунная активация, взаимодействует с генетической предрасположенностью к шизофреноподобному поведению, провоцируя данный тип психопатологии у гетерозиготных 100P/+ мышей, что подтверждает патогенность 100P мутации. Материнская иммунная активация посредством провоспалительного цитокина интерлейкина-6 вызывает шизофреноподобное поведение у 100P/+ гетерозиготных мышей.
5. Глиатрансммиттер липокалин-2 вовлечён в нейроглиальные механизмы шизофреноподобного поведения на стадии раннего развития и в превентивный эффект вальпроата.
6. Точечная мутация 100P/100P нарушает функциональные свойства N-конца *DISC1* протеина и *DISC1* интерактома, что приводит к дисбалансу дофаминергической системы, патогенному нейроразвитию и манифестации шизофреноподобного поведения у мышей, свидетельствуя о вкладе *DISC1* в дофаминергическую теорию шизофрении и теорию нейроразвития.
7. Биохимические и фармакологические исследования на основе нарушений *DISC1-L100P* интерактома предлагают межбелковые взаимодействия *DISC1* с D2 рецепторами, GSK-3 и PDE4 как перспективные мишени для диагностики и создания антипсихотиков нового поколения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балашова А.Н., Дитятев А.Э., Мухина И.В. Формы и механизмы гомеостатической синаптической пластичности. //Современные технологии в медицине. -2013. -№ 5(2). - С. 98-107.
2. Климова И.Ю., Овчинников А.А. Патоморфоз каннабиноидной зависимости у лиц, страдающих шизофренией. //Journal of Siberina Mdeical Sciences. – 2015. - №3. – С. 37.
3. Мясоедова И.А., Салмин В.В., Салмина А.Б. Голография и синтез микроструктур биополимеров для решения биомедицинских и биотехнологических задач. // V международная конференция по фотонике и информационной оптике. Сборник научных трудов. Издательство: Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ» (Москва). – 2016. – С.317-318.
4. Москаленко В.Д., Шахматова И.В., Гиндилис В.М. Медико-генетическое консультирование при шизофрении. – М.Минздрав СССР. – 1981. – С.15.
5. Снежневский А.В. Справочник по психиатрии. /Под ред. А.В. Снежневского. – М.: Медицина. – 1985. – С.83-95.
6. Abdolmaleky H.M., Cheng K., Russo A., Smith C.L., Faraone S. V., Wilcox M., Shafa R., Glatt S.J., Nguyen G., Ponte J.F., Thiagalingam S., Tsuang, M.T. Hypermethylation of the reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: A preliminary report. // Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. - 2005. – V.134B. -P.60–66
7. Abi-Dargham A., Rodenhiser J., Printz D., Zea-Ponce Y., Gil R., Kegeles L.S., Weiss R., Cooper T.B., Mann J.J., Van Heertum R.L., Gorman J.M., Laruelle M. Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. // Proc Natl Acad Sci USA. – 2000. – V.97. -P. 8104–8109.
8. Adachi M., Monteggia, L.M. Decoding transcriptional repressor complexes in the adult central nervous system. // Neuropharmacology. - 2014. -V. 80. -P. 45–52.
9. Akbarian S., Bunney W.E. Jr, Potkin S.G., Wigal S.B., Hagman J.O., Sandman C.A., Jones E.G. Altered distribution of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-diaphorase cells in frontal lobe of schizophrenics implies disturbances of cortical development. // Arch Gen Psychiatry. -1993. -V.50. -P.169 –177.
10. Akbarian S. Epigenetic mechanisms in schizophrenia. // Dialogues Clin Neurosci. - 2014. -V.16. - P. 405–17.
11. Akil M., Pierri J.N., Whitehead R.E., Edgar C.L., Mohila C., Sampson A.R., Lewis D.A. Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. // Am J Psychiatry. -1999. -V. 156. - P.1580–1589.

12. Akil, M. et al. (2000) Decreased density of tyrosine hydroxylase immunoreactive axons in the entorhinal cortex of schizophrenic subjects. *Biol. Psychiatry* 47, 361–370
13. Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. // *Nat Rev Genet.* -2016. -V. 1. -P. 1–14.
14. Ameri K., Harris A.L. Activating transcription factor 4. // *Int J Biochem Cell Biol.* - 2008. -V. 40. -P.14–21.
15. Amitai N., Semenova S., Markou A. Cognitive–disruptive effects of the psychotomimetic phencyclidine and attenuation by atypical antipsychotic medications in rats. // *Psychopharmacology (Berl).* - 2007. -V.193. -P. 521–537.
16. An J., Shi J., He Q., Lui K., Liu Y., Huang Y., Sheikh M.S. CHCM1/CHCHD6, novel mitochondrial protein linked to regulation of mitofilin and mitochondrial cristae morphology. // *J Biol Chem.* - 2012. V.287. -P.7411–7426.
17. Arguello P.A., Gogos J.A. Modeling madness in mice: one piece at a time. // *Neuron.* - 2006. -V.52. - P. 179–196.
18. Arguello P.A., Gogos J.A. Genetic and cognitive windows into circuit mechanisms of psychiatric disease. // *Trends Neurosci.* – 2012. -V.35. - P.3–13.
19. Arime Y., Fukumura R., Miura I., Mekada K., Yoshiki A., Wakana S., Gondo Y., Akiyama K. Effects of background mutations and single nucleotide polymorphisms (SNPs) on the *Disc1* L100P behavioral phenotype associated with schizophrenia in mice. // *Behav Brain Funct.* – 2014, - V.10. – P.45.
20. Ayhan Y., Abazyan B., Nomura J., Kim R., Ladenheim B., Krasnova I.N., Sawa A., Margolis R.L., Cadet J.L., Mori S., Vogel M.W., Ross C.A., Pletnikov M.V. Differential effects of prenatal and postnatal expressions of mutant human DISC1 on neurobehavioral phenotypes in transgenic mice: evidence for neurodevelopmental origin of major psychiatric disorders. // *Mol Psychiatry.* – 2011. -V.16. – P.293-306.
21. Badner J.A., Gershon E.S. Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. // *Mol Psychiatry.* – 2002. -V.7. -P.405-411.
22. Ballard T.M., Pauly-Evers M., Higgins G.A., Ouagazzal A.M., Mutel V., Borroni E., Kemp J.A., Bluethmann H., Kew J.N. Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. // *J Neurosci.* -2002. -V.22. – P.6713–6723.
23. Balduini W., Elsner J., Lombardelli G., Peruzzi G., Cattabeni F. Teatment with methylazoxymethanol at different gestational days – 2-way shuttle box avoidance and residual maze activity in rat offspring. // *Neurotoxicology.* - 1991. -V.12. – P.677–686.

24. Barak S., Weiner I. Putative cognitive enhancers in preclinical models related to schizophrenia: the search for an elusive target. // *Pharmacol Biochem Behav.* – 2011. – V.99. -P.164-189.
25. Barker D.J. Intrauterine programming of adult disease. // *Mol Med Today.* -1995. – V.1. - P.418–423.
26. Barros C.S, Calabrese B., Chamero P., Roberts A.J., Korzus E., Lloyd K., Stowers L., Mayford M., Halpain S., Muller U. Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2009. -V.106. -P.4507–4512.
27. Behrens M.M., Ali S.S., Dao D.N., Lucero J., Shekhtman G., Quick K.L., Dugan L.L. Ketamine induced loss of phenotype of fast-spiking interneurons is mediated by NADPH-oxidase. // *Science.* – 2007. V.318. -P.1645-1647.
28. Bartos M., Vida I., Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks.// *Nat Rev Neurosci.* – 2007. -V.8. – P.45-56.
29. Basar-Eroglu C., Brand A., Hildebrandt H., Karolina Kedzior K., Mathes B., Schmiedt C. Working memory related gamma oscillations in schizophrenia patients. // *International journal of psychophysiology.* – 2007. -V.64. -P. 39-45.
30. Beaulieu J.M., Sotnikova T.D., Yao W.D., Kockeritz L., Woodgett J.R., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA.* - 2004. - V.101. – P.5099–5104.
31. Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Akt/GSK-3 signaling in the action of psychotropic drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* - 2009. – V.49. – P.327–347.
32. Beaulieu J.M. A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health. // *J Psychiatry Neurosci.* -2012. -V.37. -P.7–16.
33. Beasley C.L., Reynolds G.P. Parvalbumin immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. // *Schizophr Res.* -1997. -V.24. -P.349–355.
34. Belforte J.E., Zsiros V., Sklar E.V, Jiang Z., Yu G., Li Y., Quinlan E.M. and Nakazawa K. Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. // *Nat Neurosci.* – 2010. V.13. -P.76-83.
35. Benes F.M. Myelination of cortical–hippocampal relays during late adolescence. // *Schizophr Bull.* – 1989. -V.15. -P.585–593.
36. Benveniste E.N. Cytokine actions in the central nervous system. // *Cytokine Growth Factor Rev.* -1998. -V.9. – P.259 –275.

37. Berger T., Togawa A., Duncan G.S., Elia A.J., You-Ten A., Wakeham A., Fong H.E., Cheung C.C., Mak T.W. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2006. -V.103. -P. 1834–1839.
38. Bettelli E., Carrier Y., Gao W., Korn T., Strom T.B., Oukka M., Weiner H.L., Kuchroo V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. // *Nature*. -2006. -V.441. -P.235–238.
39. Beydoun H., Saftlas A.F. Physical and mental health outcomes of prenatal maternal stress in human and animal studies: a review of recent evidence. // *Paediatr Perinat Epidemiol*. -2008. -V.22. -P.438–466.
40. Birrell J.M., Brown V.J. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. // *J Neurosci*. -2000. -V.20. -P.4320–4324.
41. Blackwood D.H., Fordyce A., Walker M.T., St Clair D.M., Porteous D.J., Muir W.J. Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. // *Am J Hum Genet*. -2001. -V.69. -P.428-433.
42. Blum B.P., Mann J.J. The GABAergic system in schizophrenia. // *Int J Neuropsychopharmacol*. – 2002. -V.5. -P.159–179.
43. Boileau I., Dagher A., Leyton M., Gunn R.N., Baker G.B., Diksic M., Benkelfat C. Modeling sensitization to stimulants in humans: an [11C]raclopride/positron emission tomography study in healthy men. // *Arch Gen Psychiatry*. -2006. -V.63. -P.1386–1395.
44. Bolton M.M., Eroglu C. Look who is weaving the neural web: glial control of synapse formation. // *Curr Opin Neurobiol*. -2009. -V.19. -P.491–497.
45. Bord L., Wheeler J., Paek M., Saleh M., Lyons-Warren A., Ross C.A., Sawamura N., Sawa A. Primate disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1): high divergence of a gene for major mental illnesses in recent evolutionary history. // *Neurosci Res*. -2006. -V.56. -P.286-293.
46. Borrell J., Vela J.M., Are'valo-Martin A., Molina-Holgado E., Guaza C. Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. -2002. V.26. -P.204 – 215.
47. Bourgeois J.P., Rakic P. Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. // *J Neurosci*. -1993. V.13. -P.2801–2820.

48. Boutros P.C., Okey A.B. Unsupervised Pattern Recognition: An Introduction to the Whys and Wherefores of Clustering Microarray Data. // *Briefings in Bioinformatics*. – 2005. - V.6. -P.331-343.
49. Bradshaw N.J., Porteous D.J. DISC1-binding proteins in neural development, signalling and schizophrenia. // *Neuropharmacology*. -2012. -V.62. -P.1230-1241.
50. Brandon N.J., Schurov I., Camargo L.M., Handford E.J., Duran-Jimeniz B., Hunt P., Millar J.K., Porteous D.J., Shearman M.S., Whiting P.J. Subcellular targeting of DISC1 is dependent on a domain independent from the Nudel binding site. // *Mol Cell Neurosci*. -2005. -V.28. -P.613-624.
51. Bradshaw N.J., Ogawa F., Antolin-Fontes B., Chubb J.E., Carlyle B.C., Christie S., Claessens A., Porteous D.J., Millar J.K. DISC1, PDE4B, and NDE1 at the centrosome and synapse. // *Biochem Biophys Res Commun*. -2008. -V.377. -P.1091–1096.
52. Braff D., Geyer M.A., Swerdlow N.R. Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies. // *Arch Gen Psychiatry*. -2001. -V.47. -P.181–188.
53. Brake W.G., Sullivan R.M., Flores G., Srivastava L.K., Gratton A. Neonatal ventral hippocampal lesions attenuate the nucleus accumbens dopamine response to stress: an electrochemical study in the adult rat. // *Brain Res*. -1999. -V.831, P.25–32.
54. Brandon N.J., Handford E.J., Schurov I., Rain J.C., Pelling M., Duran-Jimeniz B., Camargo L.M., Oliver K.R., Beher D., Shearman M.S., Whiting P.J. Disrupted in Schizophrenia and Nudel form a neurodevelopmentally regulated protein complex: implications for schizophrenia and other major neurological disorders. // *Mol Cell Neurosci*. -2004. V.25. -P.42–55.
55. Brandon N.J., Millar J.K., Korth C., Sive H., Singh K.K., Sawa A. Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development. // *J Neurosci*. - 2009. -V.29. -P.12768-12775.
56. Brandon N.J., Sawa A. Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1. // *Nat Rev Neurosci*. -2011. -V.12. -P. 707-722.
57. Brandt C.L., Doan N.T., Tønnesen S., Agartz I., Hugdahl K., Melle I., Andreassen O.A., Westlye L.T. Assessing brain structural associations with working memory related brain patterns in schizophrenia and healthy controls using linked independent component analysis. // *NeuroImage Clin*. -2015. -V.9. -P.253–263.
58. Brown A.S., Susser E.S. Prenatal nutritional deficiency and risk of adult schizophrenia. // *Schizophr Bull*. - 2008. -V.34. -P.1054–1063.
59. Brown A.S. The environment and susceptibility to schizophrenia. // *Progress in Neurobiology*. – 2011. -V.93. -P.23-58.

60. Brown A.S., Derkits E.J. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. // *American Journal of Psychiatry*. -2010. -V.167. -P.261-280.
61. Brzózka M.M., Havemann-Reinecke U., Wichert S.P., Falkai P., Rossner M.J. Molecular Signatures of Psychosocial Stress and Cognition Are Modulated by Chronic Lithium Treatment. // *Schizophr Bull*. -2016. -V.42. -P.S22-33.
62. Buchanan R.W., Kreyenbuhl J., Kelly D.L., Noel J.M., Boggs D.L., Fischer B.A., Himelhoch S., Fang B., Peterson E., Aquino P.R., Keller W. Schizophrenia Patient Outcomes Research Team (PORT). The 2009 schizophrenia PORT psychopharmacological treatment recommendations and summary statements. // *Schizophr Bull*. – 2010. -V.36. – P.71–93.
63. Buka S.K., Fan A.P. Association of prenatal and perinatal complications with subsequent bipolar disorder and schizophrenia. // *Schizophr Res*. -1999. V.39. -P.113-119.
64. Buka S.L., Cannon T.D., Torrey E.F. Torrey E.F., Yolken R.H., Collaborative Study Group on the Perinatal Origins of Severe Psychiatric Disorders. Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. // *Biological Psychiatry*. -2008. -V.63. – P.809-815.
65. Burdick K.E., Kamiya A., Hodgkinson C.A., Lencz T., DeRosse P., Ishizuka K., Elashvili S., Arai H., Goldman D., Sawa A., Malhotra A.K. Elucidating the relationship between DISC1, NDEL1 and NDE1 and the risk for schizophrenia: evidence of epistasis and competitive binding. // *Hum Mol Genet*. -2008. -V.17. -P.2462–2473.
66. Burmeister M., McInnis M.G., Zollner S. Psychiatric genetics: progress amid Controversy. // *Nature Reviews Genetics*. -2008. -V.9. -P.527-540.
67. Cafe-Mendes C.C., Ferro E.S., Britto L.R., Martins-de-Souza D. Using mass spectrometry-based peptidomics to understand the brain and disorders such as Parkinson's disease and schizophrenia. // *Curr Top Med Chem*. -2014. -V.14. – P.369-381.
68. Cairns J.M., Dunning M.J., Ritchie M.E., Russell R., Lynch A.G. BASH: a tool for managing BeadArray spatial artefacts. // *Bioinformatics*. – 2008. V. 24. -P.2921–2922.
69. Camargo L.M., Collura V., Rain J.C., Mizuguchi K., Hermjakob H., Kerrien S., Bonnert T.P., Whiting P.J., Brandon N.J. Disrupted in Schizophrenia 1 Interactome: evidence for the close connectivity of risk genes and a potential synaptic basis for schizophrenia. // *Mol Psychiatry*. - 2007. -V.12. -P.74-86.
70. Callicott J.H., Straub R.E., Pezawas L., Egan M.F., Mattay V.S., Hariri A.R., Verchinski B.A., Meyer-Lindenberg A., Balkissoon R., Kolachana B., Goldberg T.E., Weinberger

- D.R. Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2005. -V.102. -P.8627-8632.
71. Cannon M, Cotter D., Coffey V.P., Sham P.C., Takei N., Larkin C., Murray R.M., O'Callaghan E. Prenatal exposure to the 1957 influenza epidemic and adult schizophrenia: a follow-up study. // *British Journal of Psychiatry.* -1996. -V.168. -P.368-371.
72. Cardin J.A., Carlen M., Meletis K., Knoblich U., Zhang F., Deisseroth K., Tsai L. H., Moore C. I. Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. // *Nature.* – 2009. -V.459. -P.663-667.
73. Cardno A.G., Gottesman I.I. Twin studies of schizophrenia: from bow-and-arrow concordances to star wars Mx and functional genomics. // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. -V.97. -P.12.
74. Carlsson A., Lindqvist M. Effect of chlorpromazine or haloperidol on formation of 3-methoxytyramine and normetanephrine in mouse brain. // *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* – 1963. -V.20. -P.140-144.
75. Castellanos F.X., Fine E.J, Kaysen D., Marsh W.L., Rapport J.L., Hallet M. Sensorimotor gaiting in boys with Tourette's syndrome and ADHD: preliminary results. // *Biol Psychiatry.* – 1996. -V.39. -P.33–41.
76. Cannon, M., Jones, P.B., Murray, R.M., Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. // *Am. J. Psychiatry.* - 2002. -V.159. - P.1080–1092.
77. Cantor-Graae E., Selten J.P. Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. // *Am J Psychiatry.* – 2005. -V.162. P.12–24.
78. Carpenter W.T., Koenig J.I. The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. // *Neuropsychopharmacology.* - 2008. -V.33. –P. 2061–2079.
79. Carless M.A., Glahn D.C., Johnson M.P., Curran J.E., Bozaoglu K., Dyer T.D. et al. Impact of DISC1 variation on neuroanatomical and neurocognitive phenotypes. // *Mol Psychiatry.* – 2011. -V.16. -P.1096–1104.
80. Casadio P., Fernandes C., R.M. Murray et al. Cannabis use in young people: the risk for schizophrenia. // *Neuroscience and Biobehavioural Reviews.* – 2011. -V.35. –P. 1779-1787.
81. Caspi A., Moffitt T.E., Cannon M., et al. Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. // *Biol Psychiatry.* – 2005. -V.57. –P.1117–1127.

82. Cattabeni F., DiLuca M.). Developmental models of brain dysfunctions induced by targeted cellular ablations with methylazoxymethanol. // *Physiol Rev.* – 1997. -V.77. –P. 199–215.
83. Centonze D., Picconi B., Gubellini P., Bernardi G., Calabresi P., // *Eur J Neurosci.* – 2001. -V.13. – P.1071-1077.
84. Cepeda C. Levine M. S., // *Developmental neuroscience.* – 1998. -V.20. -P.1-18.
85. Chambers R.A., Moore J., McEvoy J.P., Levin E.D. Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. // *Neuropsychopharmacology.* - 1996. -V.15. - P.587–594.
86. Chambers R.A., Self D.W. Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions: an animal model of dual diagnosis schizophrenia. // *Neuropsychopharmacology.* - 2002. -V.27. –P.889–905.
87. Chateauvieux S., Morceau F., Dicato M., Diederich M. Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. // *J Biomed Biotechnol.* - 2010. – P. 479364
88. Chaturvedi, R.K., Flint Beal, M. Mitochondrial diseases of the brain. // *Free Radic. Biol. Med.* - 2013. -V.63. -P. 1–29.
89. Chen Y-J.J., Johnson M.A., Lieberman M.D., Goodchild R.E., Schobel S., Lewandowski N., Rosoklija G., Liu R-C., Gingrich J.A., Small S., Moore H., Dwork A.J., Talmage D.A., Role L.W. Type III Neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviors, and corticostriatal circuit components. // *J Neurosci.* – 2008. - V.28. –P.6872–6883.
90. Choi J., Lee H.W., Suk K. Increased plasma levels of lipocalin 2 in mild cognitive impairment. // *J Neurol Sci.* – 2011. -V.305. –P.28–33.
91. Chubb, J.E., Bradshaw, N.J., Soares, D.C., Porteous, D.J. Millar, J.K., The DISC locus in psychiatric illness. // *Mol Psychiatry.* - 2008.- V.13(1). –P.36-64.
92. Clapcote, S.J., Lipina, T.V., Millar, J.K., Mackie, S., Christie, S., Ogawa, F., Lerch, J.P., Trimble, K., Uchiyama, M., Sakuraba, Y., Kaneda, H., Shiroishi, T., Houslay, M.D.,Henkelman, R.M., Sled, J.G., Gondo, Y., Porteous, D.J., Roder, J.C. Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice. // *Neuron.* -2007. -V.54. -P. 387–402.
93. Cobb S. R., Buhl E. H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P. Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. // *Nature.* – 1995. - V.378. P.- 75-78.
94. Cohen B.D., Rosenbaum G., Luby E.D., Gottlieb J.S. Comparison of phencyclidine hydrochloride (sernyl) with other drugs: simulation of schizophrenic performance with phencyclidine hydrochloride (sernyl), lysergic acid diethylamide (LSD-25), and

- amobarbital (amytal) sodium; II. Symbolic and sequential thinking. // *Arch Gen Psychiatry*. - 1962. -V.6. -P.395–401.
95. Colacicco G., Welzl H., Lipp H.P., Wurbel H. Attentional set-shifting in mice: Modification of a rat paradigm, and evidence for strain-dependent variation. // *Behav Brain Res*. – 2002. -V.132. – P. 95–102.
96. Coyle J.T., Tsai G., Goff D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. // *Ann N Y Acad Sci*. - 2003. -V.1003. – P. 318–327.
97. Crider A. Perseveration in schizophrenia. // *Schizophr Bull*. – 1997. -V.23. – P. 63–74.
98. Cross-Disorder Group of the Psychiatric Genomics Consortium, et al. Genetic relationship between five psychiatric disorders estimated from genome-wide SNPs. // *Nat Genet*. - 2013. -V.45. – P. 984–994.
99. Crow T. J. The emperors of the schizophrenia polygene have no clothes. // *Psychol. Med*. – 2008. -V.38. – P.1681-1685.
100. Crowley J.J., Hilliard C.E., Kim Y., Morgan M.B., Lewis L.R., Muzny D.M. et al. Deep resequencing and association analysis of schizophrenia candidate genes. // *Mol Psychiatry*. – 2012. -V.18. – P.138–140.
101. Cui, Y., Prabhu, V., Nguyen, T.B., Yadav, B.K., Chung, Y.-C., Hashimoto, K. The mRNA Expression Status of Dopamine Receptor D2, Dopamine Receptor D3 and DARPP-32 in T Lymphocytes of Patients with Early Psychosis. // *Int. J. Mol. Sci*. -2015. -V.16. -P.26677–26686.
102. Dahoun T., Trossbach S.V., Brandon N.J., Korth C., Howes O.D. The impact of Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) on the dopaminergic system: a systematic review. // *Transl Psychiatry*. – 2017. -V.7(1). – P.1015
103. Davalieva, K., Maleva Kostovska, I., Dwork, A.J. Proteomics Research in Schizophrenia. // *Front. Cell. Neurosci*. – 2016. -V.10. – P.18.
104. David, D.J., Renard, C.E., Jolliet, P., Hascoët, M., and Bourin, M. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. // *Psychopharmacology (Berl)*. - 2003. -V.166. –P.373–382.
105. Davis K.L., Kahn R.S., Ko G., Davidson M. Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. // *Am J Psychiatry*. -1991. -V.148. -P.1474–1486.
106. Dazzan, P. Neuroimaging biomarkers to predict treatment response in schizophrenia: The end of 30 years of solitude? // *Dialogues Clin. Neurosci*. -2014. -V. 16. P.491–503.
107. DeFries J. C., Fulker D. W. Multiple regression analysis of twin data. // *Behav. Genet*. – 1985. -V.15. –P.467-473.

108. Derntl, B., Seidel, E.M., Schneider, F., Habel, U. How specific are emotional deficits? A comparison of empathic abilities in schizophrenia, bipolar and depressed patients. // *Schizophr. Res.* - 2012. -V. 142. -P.58–64.
109. Donohoe G., Robertson I.H. Can specific deficits in executive functioning explain the negative symptoms of schizophrenia? A review. // *Neurocase.* – 2003. -V.9. – P.97–108.
110. Dunning M.J., Smith M.L., Ritchie M.E., Tavares S. Bead array: R classes and methods for Illumine bead-based data. // *Bioinformatics.* -2007. -V.23. -P.2183–2184.
111. Eastwood, S.L., Harrison, P.J. Interstitial white matter neurons express less reelin and are abnormally distributed in schizophrenia: towards an integration of molecular and morphologic aspects of the neurodevelopmental hypothesis. // *Mol Psychiatry.* - 2003. - V.8 (9)769. –P.821-731.
112. Edwards D. Non-linear normalization and background correction in onechannel cDNA microarray studies. // *Bioinformatics.* – 2003. -V.19. -P.825–833.
113. Egan, M.F. et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. -V.98. –P. 6917–6922.
114. Egashira N., Tanoue A., Higashihara F., Fuchigami H., Sano, K., Mishima, K., Fukue, Y., Nagai, H., Takano, Y., Tsujimoto, G., et al. Disruption of the prepulse inhibition of the startle reflex in vasopressin V1b receptor knockout mice: reversal by antipsychotic drugs. // *Neuropsychopharmacology.* - 2005. -V. 30. P.1996–2005.
115. Egerton A., Reid L., McKerchar C.E., Morris B.J., Pratt J.A. Impairment in perceptual attentional setshifting following PCP administration: A rodent model of setshifting deficits in schizophrenia. // *Psychopharmacology (Berl).* -2005. -V.179. -P.77–84
116. Egerton A., Chaddock C.A., Winton-Brown T.T., Bloomfield M.A., Bhattacharyya S., Allen P. et al. Presynaptic striatal dopamine dysfunction in people at ultra-high risk for psychosis: findings in a second cohort. // *Biol Psychiatry.* – 2013. - V.74. – P.106–112.
117. Ehrlich S., Brauns S., Yendiki A., Ho B.-C., Calhoun V., Schulz S.C., Gollub R.L., Sponheim S.R. Associations of Cortical Thickness and Cognition in Patients With Schizophrenia and Healthy Controls. // *Schizophr. Bull.* - 2012. -V.38. –P.1050–1062.
118. Elvevag B., Goldberg T.E. Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. // *Crit Rev Neurobiol.* -2000. -V.14. -P.1–21.

119. Emamian E.S., Hall D., Birnbaum M.J., Karayiorgou M. Gogos, J.A. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 β signaling in schizophrenia. // *Nat Genet.* – 2004. - V.36. –P.131–137.
120. Endo K., Hori T., Abe S., Asada T. Alterations in GABA(A) receptor expression in neonatal ventral hippocampal lesioned rats: comparison of prepubertal and postpubertal periods. // *Synapse.* - 2007. -V.61. –P.357–366.
121. Enomoto A., Asai N., Namba T., Wang Y., Kato T., et al. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. // *Neuron.* – 2009. -V.63. –P. 774–787.
122. Eskes C., Honegger P., Juillerat-Jeanneret L., Monnet-Tschudi F. Microglial reaction induced by noncytotoxicmethylmercury treatment leads to neuroprotection via interactions with astrocytes and IL-6 release. // *Glia.* – 2002. -V.37. –P.43–52.
123. Fatemi S.H., Emamian E.S., Sidwell R.W., Kist D.A., Strydom A.J., Earle J.A., Thuras P. Human influenza viral infection in utero alters glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the developing brains of neonatal mice. // *Mol Psychiatry.* – 2002. - V. 7. –P. 633– 640.
124. Fatemi S.H., Araghi-Niknam M., Laurence J.A., Strydom A.J., Sidwell R.W., Lee S. Glial fibrillary acidic protein and glutamic acid decarboxylase. // *Schizophrenia Research.* – 2004. -V.69. -P.121-123.
125. Featherstone R.E., Kapur S., Fletcher P.J. The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* - 2007. -V.31. –P. 1556–1571.
126. Featherstone R.E., Rizos Z., Kapur S., Fletcher P.J. A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. // *Behav Brain Res.* - 2008. -V.189. –P.170–179.
127. Fiore M., Talamini L., Angelucci F., Koch T., Aloe L., Korf J. Prenatal methylazoxymethanol acetate alters behavior and brain NGF levels in young rats: a possible correlation with the development of schizophrenia-like deficits. // *Neuropharmacology.* -1999. -V. 38. –P.857–869.
128. Fiore M., Grace A.A., Korf J., Stampaciacchiere B., Aloe L. Impaired brain development in the rat following prenatal exposure to methylazoxymethanol acetate at gestational day 17 and neurotrophin distribution. // *Neuroreport.* - 2004. -V.15. –P.1791–1795.
129. Fiore M., Di Fausto V., Iannitelli A., Aloe L. Clozapine or haloperidol in rats prenatally exposed to methylazoxymethanol, a compound inducing entorhinal–

- hippocampal deficits, alter brain and blood neurotrophins' concentrations. // *Ann Ist Super Sanita.* - 2008. -V.44. -P. 167–177.
130. Flagstad P., Mork A., Glenthøj B.Y., van Beek J., Michael-Titus A.T., Didriksen M. Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. // *Neuropsychopharmacology.* - 2004. - V.29. -P. 2052–2064.
131. Fletcher P.J., Tenn C.C., Rizos Z., Lovic V., Kapur S. Sensitization to amphetamine, but not PCP, impairs attentional set shifting: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. // *Psychopharmacology (Berl).* - 2005.- V.183. -P.190–200
132. Flood D.G., Choinski M., Marino M.J., Gasior M. Mood stabilizers increase prepulse inhibition in DBA/2NCRl mice. // *Psychopharmacology (Berl).* – 2009. -V.205. -P.369–377.
133. Flores G., Alquicer G., Silva-Gomez A.B., Zaldivar G., Stewart J., Quirion R. *et al.* Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. // *Neuroscience.* - 2005. -V.133. - P.463–470.
134. Flores 3rd, R., Hirota Y., Armstrong B., Sawa A., Tomoda T. DISC1 regulates synaptic vesicle transport via a lithium-sensitive pathway. // *Neurosci. Res.* – 2011. - V.71. -P.71–77.
135. Fone K.C.F., Porkess M.V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents – relevance to developmental neuropsychiatric disorders. // *Neurosci Biobehav Rev.* - 2008. - V.32. -P.1087–1102.
136. Fortier M.E., Joobar R., Luheshi G.N., Boksa P. Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. // *J Psychiatr Res.* - 2004. -V. 38. -P.335–345.
137. Franklin, K.B.J. Paxinos, G. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* // Academic Press, San Diego. – 1997.
138. Freed W.J., Bing L.A., Wyatt R.J. Effects of neuroleptics on phencyclidine (PCP)-induced locomotor stimulation in mice. // *Neuropharmacology.* – 1984. -V.23. -P.175–181.
139. Freedman R., Waldo M., Bickford-Wilmer P., Nagamoto H. Elementary neuronal dysfunctions in schizophrenia. // *Schizophrenia Research.* – 1991.-V.4. P.233–243.

140. Fujita T., Maturana A.D., Ikuta J., Hamada J., Walchli S., Suzuki T., Sawa H., Wooten M.W., Okajima T., Tatematsu K., Tanizawa K., Kuroda S. Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2007. - V.361. - P. 605–610.
141. Fukunaga, K., Shioda, N. Novel dopamine D2 receptor signaling through proteins interacting with the third cytoplasmic loop. *Mol. Neurobiol.* - 2012. - V.45. - P.144–152.
142. Fuxe K., Borroto-Escuela D.O., Marcellino D., Romero-Fernandez W., Frankowska M., Guidolin D., Filip M., Ferraro L., Woods A.S., Tarakanov A., Ciruela F., Agnati L.F., Tanganelli S. GPCR heteromers and their allosteric receptor-receptor interactions. // *Curr. Med. Chem.* - 2012. - V.19(3). - P.356-363.
143. Gainetdinov R.R., Mohn A.R., Caron M.G. Genetic animal models: Focus on schizophrenia. // *Trends Neurosci.* - 2001. - V.24(9). - P.527-533.
144. Gainetdinov R.R., Wetsel W.C., Jones S.R., Levin E.D., Jaber M., Caron M.G. Role of serotonin in the paradoxical calming effect of psychostimulants on hyperactivity. // *Science.* - 1999. - V.283(5400). - P.397-401.
145. Gainetdinov R.R., Bohn L.M., Sotnikova T.D., Cyr M., Laakso A., Macrae A.D., Torres G.E., Kim K.M., Lefkowitz R.J., Caron M.G., Premont R.T. Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. // *Neuron.* - 2003. - V.38(2). - P. 291-303.
146. Geddes J.R., Lawrie S.M., Obstetric complications and schizophrenia: a metaanalysis. // *Br. J. Psychiatry.* - 1995. - V.167(6). - P.786-793.
147. George S.R., Watanabe M., DiPaolo T., Falardeau P., Labrie F., Seeman P. The functional state of the dopamine receptor in the anterior pituitary is in the high affinity form. // *Endocrinology.* - 1985. - V.117(2). - P.690-697.
148. Garey L.J., Ong W.Y., Patel T.S., Kanani M., Davis A., Mortimer A.M., Barnes T.R., Hirsch S.R. Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* - 1998. - V.65(4). - P.446-453.
149. Geyer M.A., Krebs-Thomson K., Braff D.L., Swerdlow N.R. Pharmacological studies of prepulse inhibition models sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. // *Psychopharmacology (Berl.).* - 2001. - V.156(2-3). - P.117-154.
150. Gielen M., Lindsey P.J., Derom C., Smeets H.J.M., Souren N.Y., Paulussen A.D.C., Derom R., Nijhuis J.G. Modeling Genetic and Environmental Factors to Increase Heritability and Ease the Identification of Candidate Genes for Birth Weight: A Twin Study. // *Behav. Genet.* - 2008. - V.38(1). - P.44-54.

151. Giovanoli S., Engler H., Engler A., Richetto J., Feldon J., Riva M.A., Schedlowski M., Meyer U. Preventive effects of minocycline in a neurodevelopmental two-hit model with relevance to schizophrenia. // *Transl. Psychiatry*. - 2016. -V.6. -P. e772.
152. Giusti L., Ciregia F., Mazzoni M.R., Lucacchini A. Proteomics insight into psychiatric disorders: an update on biological fluid biomarkers. // *Expert Rev. Proteomics*. - 2016. - P.1-10.
153. Goel N., Bale T.L. Examining the intersection of sex and stress in modelling neuropsychiatric disorders. // *J. Neuroendocrinol.* - 2009. - V.21(4). - P.415-420.
154. Goldberg T.E, Weinberger D.R. Schizophrenia, training paradigms, and the Wisconsin Card Sorting Test redux. // *Schizophr. Res.* - 1994. - V.11(3). - P.291-296.
155. Goldman-Rakic P.S. The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. // *Biol. Psychiatry*. - 1999. - V.46(5). - P.650-661.
156. Goldman-Rakic P.S., Castner S.A., Svensson T.H., Siever L.J., Williams G.V. Targeting the dopamine D-1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. // *Psychopharmacology (Berl.)*. - 2004. - V.174(1). - P.3-16.
157. Gonzalez-Burgos G., Hashimoto T., Lewis D.A. Alterations of cortical GABA neurons and network oscillations in schizophrenia. // *Curr. Psychiatry Rep.* - 2010. - V.12(4). - P.335-344.
158. Gonzalez-Burgos G., Lewis D.A. NMDA receptor hypofunction, parvalbumin-positive neurons, and cortical gamma oscillations in schizophrenia. // *Schizophr. Bull.* - 2012. - V.38(5). - P.950-957.
159. Gorelova N., Seamans J.K., Yang C.R. Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. // *J. Neurophysiol.* - 2002. - V.88(6). - P.3150-3166.
160. Gottesman I.I. A series of books in psychology. Schizophrenia genesis: The origins of madness. New York: W.H. Freeman/Times Books/Henry Holt & Co.- 1991. - P. 296.
161. Gouweleeuw L., Naudé P.J., Rots M., DeJongste M.J., Eisel U.L., Schoemaker R.G. The role of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) as biological constituent linking depression and cardiovascular disease. // *Brain Behav. Immun.* - 2015. - V.46. - P.23-32.

162. Gray N.S., Hemsley D.R., Gray J.A. Abolition of latent inhibition in acute, but not chronic, schizophrenics. // *Neurol. Psychiatry Brain Res.* - 1992. - V.1. - P.83-89.
163. Gray J.E., Infante J.R., Brail L.H., Simon G.R., Cooksey J.F., Jones S.F., Farrington D.L., Yeo A., Jackson K.A., Chow K.H., Zamek-Gliszczynski M.J., Burris H.A. 3rd. A first-in-human phase I dose-escalation, pharmacokinetic, and pharmacodynamic evaluation of intravenous LY2090314, a glycogen synthase kinase 3 inhibitor, administered in combination with pemetrexed and carboplatin. // *Invest. New Drugs.* - 2015. - V.33(6). - P.1187-1196.
164. Guest P.C., Guest F.L., Martins-de Souza D. Making sense of blood-based proteomics and metabolomics in psychiatric research. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* - 2016. - V.19(6). -P.pyv138
165. Guidotti A., Auta J., Davis J.M., Dong E., Gavin D.P., Grayson D.R., Sharma R.P., Smith R.C., Tueting P., Zhubi A. Toward the identification of peripheral epigenetic biomarkers of schizophrenia. // *J. Neurogenet.* - 2014. - V.28(1-2). - P.41-52.
166. Gray J.A, Pickering A.D., Hemsley D.R., Dawling S., Gray J.A. Abolition of latent inhibition by a single 5 mg/kg dose of d-amphetamine in man. // *Psychopharmacology* - 1992. - V.107(2-3). - P.425-430.
167. Green M.F. Cognitive remediation in schizophrenia: is it time yet? // *Am. J. Psychiatry.* - 1993. - V.150(2). - P.178-187.
168. Gur R.E., Cowell P.E., Latshaw A., Turetsky B.I., Grossman R.I., Arnold S.E., Bilker W.B., Gur R.C. Reduced dorsal and orbital prefrontal gray matter volumes in schizophrenia. // *Arch. Gen. Psychiatry.* - 2000. - V.57(8). - P.761-768.
169. Gyorffy B.A., Gulyassy P., Gellen B., Volgyi K., Madarasi D., Kis V., Ozohanics O., Papp I., Kovacs P., Lubec G., Dobolyi A., Kardos J., Drahos L., Juhasz G., Kekesi K.A. Widespread alterations in the synaptic proteome of the adolescent cerebral cortex following prenatal immune activation in rats. // *Brain Behav. Immun.* - 2016. - V.56. - P.289-309.
170. Haenschel C., Linden D. Exploring intermediate phenotypes with EEG: working memory dysfunction in schizophrenia. // *Behav. Brain Res.* - 2011. - V.216(2). - P.481-495.
171. Hakak Y., Walker J.R., Li C., Wong W.H., Davis K.L., Buxbaum J.D., Haroutunian V., Fienberg A.A. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2001. - V.98(8). - P.4746-4751.

172. Hall J., Trent S., Thomas K.L., O'Donovan M.C., Owen M.J. Genetic risk for schizophrenia: convergence on synaptic pathways involved in plasticity. // *Biol. Psychiatry*. - 2015. - V.77(1). - P.52-58.
173. Hartwig F.P., Borges M.C., Horta B.L., Bowden J., Davey Smith G. Inflammatory biomarkers and risk of schizophrenia: a 2-Sample mendelian randomization study. // *JAMA Psychiatry*. - 2017. - V.74(12). - P.1226-1233.
174. Harrison P.J., Weinberger D.R. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. // *Mol. Psychiatry*. - 2005. - V.10(1). - P.40-68.
175. Hashimoto T., Nguyen Q.L., Rotaru D., Keenan T., Arion D., Beneyto M., Gonzalez-Burgos G., Lewis D.A. Protracted developmental trajectories of GABAA receptor $\alpha 1$ and $\alpha 2$ subunit expression in primate prefrontal cortex. // *Biol. Psychiatry*. - 2009. - V.65(12). - P.1015-1023.
176. Hayashi-Takagi A., Takaki M., Graziane N., Seshadri S., Murdoch H., Dunlop A.J., Makino Y., Seshadri A.J., Ishizuka K., Srivastava D.P., Xie Z., Baraban J.M., Houslay M.D., Tomoda T., Brandon N.J., Kamiya A., Yan Z., Penzes P., Sawa A. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. // *Nat. Neurosci*. - 2010. - V.13(3). - P.327-332.
177. He Y., Yu Z., Giegling I., Xie L., Hartmann A.M., Prehn C., Adamski J., Kahn R., Li Y., Illig T., Wang-Sattler R., Rujescu D. Schizophrenia shows a unique metabolomics signature in plasma. // *Transl. Psychiatry*. - 2012. - V.2. - P.e149.
178. Henry S.A., Dulawa S.C., Conquet E., Geyer M.A. Severe disruption of prepulse inhibition (PPI) in mice lacking mGluR5. // *Soc. Neurosci. Abstr.* -1999. - V.25. - P.405-412
179. Heinrichs R.W., Awad A.G. Neurocognitive subtypes of chronic schizophrenia. // *Schizophr. Res.* - 1993. - V.9(1). - P.49-58.
180. Hertzmann M., Reba R.C., Kotlyarov E.V. Single photon emission computed tomography in phencyclidine and related drug abuse. // *Am. J. Psychiatry*. - 1990. - V.147(2). - P.255-256.
181. Hikida T., Jaaro-Peled H., Seshadri S., Oishi K., Hookway C., Kong S., Wu D., Xue R., Andrade M., Tankou S., Mori S., Gallagher M., Ishizuka K., Pletnikov M., Kida S., Sawa A. Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2007. - V.104(36). - P.14501-14506.

182. Hornung J.P., Fritschy, J.M. Developmental profile of GABAA-receptors in the marmoset monkey: expression of distinct subtypes in pre- and postnatal brain. // *J. Comp. Neurol.* - 1996. - V.367(3). - P.413-430.
183. Howes O.D., Murray R.M. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. // *Lancet.* - 2014. - V.383(9929). - P.1677-1687.
184. Hultman C.M., Sparé'n P., Takei N., Murray R.M., Cnattingius S. Prenatal and perinatal risk factors for schizophrenia, affective psychosis, and reactive psychosis of early onset: case-control study. // *BMJ.* - 1999. - V.318(7181). - P.421-426.
185. Huttenlocher P.R. Synaptic density in human frontal cortex - developmental changes and effects of aging. // *Brain Res.* - 1979. - V.163(2). - P.195-205.
186. Huotari M., Garcia-Horsman J.A., Karayiorgou M., Gogos J.A., Mannisto P.T. D-amphetamine responses in catechol-O-methyltransferase (COMT) disrupted mice. // *Psychopharmacology (Berl.)*. - 2004. - V.172(1). - P.1-10.
187. Hoek H.W., Brown A.S., Susser E. The Dutch famine and schizophrenia spectrum disorders. // *Soc. Psychiatry Psychiatr. Epidemiol.* - 1998. - V.33(8). - P.373-379.
188. Holmes E., Tsang T.M., Huang J.T., Leweke F.M., Koethe D., Gerth C.W., Nolden B.M., Gross S., Schreiber D., Nicholson J.K., Bahn S. Metabolic profiling of CSF: evidence that early intervention may impact on disease progression and outcome in schizophrenia. // *PLoS Med.* - 2006. - V.3(8). - e327.
189. Hooks M.S., Kalivas P.W. The role of mesoaccumbens-pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation. // *Neuroscience.* - 1995. - V.64(3). - P.587-597.
190. Howard M.W, Rizzuto D.S., Caplan J.B., Madsen J.R., Lisman J., Aschenbrenner-Scheibe R., Schulze-Bonhage A., Kahana M.J. Gamma oscillations correlate with working memory load in humans. // *Cereb. Cortex.* - 2003. - V.13(12). - P.1369-1374.
191. Howes S.R., Dalley J.W., Morrison C.H., Robbins T.W., Everitt B.J. Leftward shift in the acquisition of cocaine selfadministration in isolation-reared rats: relationship to extracellular levels of dopamine, serotonin and glutamate in the nucleus accumbens and amygdala-striatal FOS expression. // *Psychopharmacology (Berl.)*. - 2000. - V.151(1). - P.55-63.
192. Howes O.D., Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III – the final common pathway. // *Schizophr. Bull.* - 2009. - V.35(3). - P.549-562.
193. Howes O.D., Montgomery A.J., Asselin M.C., Murray R.M., Valli I., Tabraham P., Bramon-Bosch E., Valmaggia L., Johns L., Broome M., McGuire P.K., Grasby P.M.

- Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. // Arch. Gen. Psychiatry. - 2009. - V.66(1). - P.13-20.
194. Howes O., McCutcheon R., Stone J. Glutamate and dopamine in schizophrenia: an update for the 21st century. // J. Psychopharmacol. - 2015. - V.29(2). - P.97-115.
 195. Howes O.D., McCutcheon R., Owen M.J., Murray R.M. The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia. // Biol. Psychiatry. - 2017. - V.81(1). - P.9-20.
 196. Hradetzky E., Sanderson T.M., Tsang T.M., Sherwood J.L., Fitzjohn S.M., Lakics V., Malik N., Schoeffmann S., O'Neill M.J., Cheng T.M., Harris L.W., Rahmoune H., Guest P.C., Sher E., Collingridge G.L., Holmes E., Tricklebank M.D., Bahn S. The methylazoxymethanol acetate (MAM-E17) rat model: molecular and functional effects in the hippocampus. // Neuropsychopharmacology. - 2012. - V.37(2). - P.364-377.
 197. Huh G.S., Boulanger L.M., Du H., Riquelme P.A., Brotz T.M., Shatz C.J. Functional requirement for class IMHC in CNS development and plasticity. // Science. - 2000. - V.290(5499). - P.2155-2159.
 198. Hutchison K.E., Swift R. Effect of *d*-amphetamine on prepulse inhibition of the startle reflex in humans. // Psychopharmacology (Berl.). - 1999. - V.143(4). - P.394-400.
 199. International Schizophrenia Consortium, Purcell S.M., Wray N.R., Stone J.L., Visscher P.M., O'Donovan M.C., Sullivan P.F., Sklar P. Common polygenic variation contributes to risk of schizophrenia and bipolar disorder. // Nature. - 2009. - V.460(7256). - P.748-752.
 200. Insel T.R. Rethinking schizophrenia. // Nature - 2010. - V.468(7321). - P.187-193.
 201. Ishizuka K., Kamiya A., Oh E.C., Kanki H., Seshadri S., Robinson J.F., Murdoch H., Dunlop A.J., Kubo K., Furukori K., Huang B., Zeledon M., Hayashi-Takagi A., Okano H., Nakajima K., Houslay M.D., Katsanis N., Sawa A. DISC1-dependent switch from progenitor proliferation to migration in the developing cortex. // Nature. - 2011. - V.473(7345). - P.92-96.
 202. Iwazaki T., McGregor I.S., Matsumoto I. Protein expression profile in the amygdala of rats with methamphetamine-induced behavioral sensitization. // Neurosci. Lett. - 2008. - V.435(2). - P.113-119.
 203. Iwamoto K., Bundo M., Yamada K., Takao H., Iwayama-Shigeno Y., Yoshikawa T., Kato T. DNA methylation status of SOX10 correlates with its downregulation and oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia. // J. Neurosci. - 2005. - V.25(22). - P.5376-5381.

204. Jaaro-Peled H., Ayhan Y., Pletnikov M., Sawa A. Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models. // *Schizophr. Bull.* - 2010. - V.36(2). - P. 301-313.
205. Jaaro-Peled H., Niwa M., Foss C.A., Murai R., de Los Reyes S., Kamiya A., Mateo Y., O'Donnell P., Cascella N.G., Nabeshima T., Guilarte T.R., Pomper M.G., Sawa A. Subcortical dopaminergic deficits in a DISC1 mutant model: a study in direct reference to human molecular brain imaging. // *Hum. Mol. Genet.* - 2013. - V.22(8). - P.1574-1580.
206. Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. // *Nat. Genet.* - 2003. - V.33. - P.245-254.
207. James R., Adams R.R., Christie S., Buchanan S.R., Porteous D.J., Millar J.K. Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1) is a multicompartimentalized protein that predominantly localizes to mitochondria. // *Mol. Cell. Neurosci.* - 2004. - V.26(1). - P.112-122.
208. Janitzky K., Lippert M.T., Engelhorn A., Tegtmeier J., Goldschmidt J., Heinze H.J., Ohl F.W. Optogenetic silencing of locus coeruleus activity in mice impairs cognitive flexibility in an attentional set-shifting task. // *Front. Behav. Neurosci.* - 2015. - V.9. - P.286
209. Janowsky D.S., el-Yousel M.K., Davis J.M., Sekerke H.J. Provocation of schizophrenic symptoms by intravenous administration of methylphenidate. // *Arch. Gen. Psychiatry.* - 1973. - V.28(2). - P.185-191.
210. Javitt D.C., Zukin S.R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. // *Am. J. Psychiatry.* - 1991. - V.148(10). - P.1301-1308.
211. Javitt D.C., Balla A., Burch S., Suckow R., Xie S., Sershen H. Reversal of phencyclidine-induced dopaminergic dysregulation by N-methyl-D-aspartate receptor/glycine-site agonists. // *Neuropsychopharmacology.* - 2004. - V.29(2). - P. 300-307.
212. Jentsch J.D., Tran A., Le D., Youngren K.D., Roth R.H. Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. // *Neuropsychopharmacology.* - 1997. - V.17(2). - P. 92-99.
213. Jentsch J.D., Taylor J.R., Roth R.H. Subchronic phencyclidine administration increases mesolimbic dopaminergic system responsivity and augments stress- and psychostimulant-induced hyperlocomotion. // *Neuropsychopharmacology.* - 1998. - V.19(2). - P.105-113.

214. Jentsch J.D., Roth R.H. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. // *Neuropsychopharmacology*. - 1999. - V.20(3). - P.201-225.
215. Jenuwein T., Allis C.D. Translating the Histone Code. // *Science* - 2001. - V.293(5532). - P.1074-1080.
216. Jespersen A., Tajima N., Fernandez-Cuervo G., Garnier-Amblard E.C., Furukawa H. Structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors. // *Neuron*. - 2014. - V.81(2). - P.366-378.
217. Johnstone M., Thomson P.A., Hall J., McIntosh A.M., Lawrie S.M., Porteous D.J. DISC1 in schizophrenia: genetic mouse models and human genomic imaging. // *Schizophr. Bull.* - 2011. - V.37(1). - P.14-20.
218. Jones G.H. Social isolation and individual differences: behavioural and dopaminergic responses to psychomotor stimulants. // *Clin. Neuropharmacol.* - 1992. - V.15. - P.253A-254A.
219. Jones G.H., Hernandez T.D., Kendall D.A., Marsden C.A., Robbins T.W. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and *in vivo* neurochemistry. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1992. - V.43(1). - P.17-35.
220. Jones H. B., Faham M. Evidence and implications for multiplicative interactions among loci predisposing to human common disease. // *Hum. Hered.* - 2005. - V.59(3). - P.176-184.
221. Jones C., Brown A.M., Auer D.P., Fone K.C.F. The mGluR2/3 agonist LY379268 reverses post-weaning social isolation induced recognition memory deficits in the rat. // *Psychopharmacology (Berl.)*. - 2011. - V. 214. - P.269-283.
222. Ju P., Cui D. The involvement of N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) subunit NR1 in the pathophysiology of schizophrenia. // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 2016. - V.48(3). - P.209-19.
223. Kaddurah-Daouk R., McEvoy J., Baillie R.A., Lee D., Yao J.K., Doraiswamy P.M., Krishnan K.R.R. Metabolomic mapping of atypical antipsychotic effects in schizophrenia. // *Mol. Psychiatry*. - 2007. - V.12. - P.934-945.
224. Kahlig K.M., Binda F., Khoshbouei H., Blakely R.D., McMahon D.G., Javitch J.A., Galli A. Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 2005. - V.102. - P.3495-3500.

225. Kalinichev M., Robbins M.J., Hartfield E.M., Maycox P.R., Moore S.H., Savage K.M., Austin N.E., Jones D.N. Comparison between intraperitoneal and subcutaneous phencyclidine administration in Sprague-Dawley rats: a locomotor activity and gene induction study. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* - 2007. - V.32. - P.414-422.
226. Kalmady S.V., Venkatasubramanian G., Shivakumar V., Gautham S., Subramaniam A., Jose D.A., Maitra A., Ravi V., Gangadhar B.N. Relationship between Interleukin-6 gene polymorphism and hippocampal volume in antipsychotic-naïve schizophrenia: evidence for differential susceptibility? // *PLOS One.* - 2014. - May, 2;9(5):e96021.
227. Kamiya A., Kubo K., Tomoda T., Takaki M., Youn R., Ozeki Y., Sawamura N., Park U., Kudo C., Okawa M., Ross C.A., Hatten M.E., Nakajima K. and Sawa A. A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. // *Nat. Cell Biol.* - 2005. - V.7(12). - P.1167-1178.
228. Kamiya A., Tan P.L., Kubo K., Engelhard C., Ishizuka K., Kubo A., Tsukita S., Pulver A.E., Nakajima K., Cascella N.G., Katsanis N., Sawa A. Recruitment of PCM1 to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4: a candidate for psychiatric illnesses. // *Arch. Gen. Psychiatry.* - 2008. - V.65. - P.996-1006.
229. Karakas E., Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. // *Science.* - 2014. - V.344. - P.992-997.
230. Karasawa J., Hashimoto K., Chaki S., D-Serine and a glycine transporter inhibitor improve MK-801-induced cognitive deficits in a novel object recognition test in rats. // *Behav. Brain Res.* - 2008. - V.186. - P.78-83.
231. Karle J., Clemmesen L., Hansen L., Andersen M., Andersen J., Fensbo C., Sloth-Nielsen M., Skrummsager B. K., Lublin H., Gerlach J. NNC 01-0687, a selective dopamine D1 receptor antagonist, in the treatment of schizophrenia. // *Psychopharmacology (Berl.).* - 1995. - V.121. - P.328-329.
232. Kegeles L.S., Martinez D., Kochan L.D., Hwang D.R., Huang Y., Mawlawi O., Suckow R.F., Van Heertum R.L., Laruelle M. NMDA antagonist effects on striatal dopamine release: positron emission tomography studies in humans. // *Synapse.* - 2002. - V.43. - P.19-29.
233. Kellendonk C., Simpson E.H., Polan H.J., Malleret G., Vronskaya S., Winiger V., Moore H., Kandel E.R. Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning. // *Neuron.* - 2006. - V.49(4). - P.603-15.

234. Kelly B.D., O'Callaghan E., Waddington J.L. Feeney L., Browne S., Scully P.J., Clarke M., Quinn J.F., McTigue O., Morgan M.G., Kinsella A., Larkin C. Schizophrenia and the city: A review of literature and prospective study of psychosis and urbanicity in Ireland. // *Schizophrenia Research*. - 2010. - V.116(1). - P.75-89.
235. Keshavan M.S., Anderson S., Pettegrew J.W. Is schizophrenia due to excessive synaptic pruning in the prefrontal cortex? The Feinberg hypothesis revisited. // *J. Psychiatr. Res.* - 1994. - V.28. - P.239-265.
236. Khashan A.S., Abel K.M., McNamee R., Pedersen M.G., Webb R.T., Baker P.N., Kenny L.C., Mortensen P.B. Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. // *Arch. Gen. Psychiatry*. - 2008. - V.65. - P.146-152.
237. Kim H.J., Rowe M., Ren M., Hong J.S., Chen P.S. Chuang D.M. Histone deacetylase inhibitors exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat permanent ischemic model of stroke: multiple mechanisms of action. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2007. - V.321. - P.892-901.
238. Kim J.S., Kornhuber H.H., Schmid-Burgk W., Holzmuller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. // *Neurosci. Lett.* - 1980. - V.20. - P.379-382.
239. Kim J.Y., Duan X., Liu C.Y., Jang M.H., Guo J.U., Pow-anpongkul N., Kang E., Song H., Ming G.L. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. // *Neuron*. - 2009. - V.63. - P.761-773.
240. Kim Y., Zerwas S., Trace S.E., Sullivan P.F. Schizophrenia genetics: where next? // *Schizophr. Bull.* - 2011. - V.37. - P.456-463.
241. Kirby B.P., Waddington J.L., O'Tuathaigh C.M. Advancing a functional genomics for schizophrenia: psychopathological and cognitive phenotypes in mutants with gene disruption. // *Brain Res Bull.* - 2010. - V.83. - P.162-176.
242. Kirkbride J.B., Jones P.B. The prevention of schizophrenia-what can we learn from eco-epidemiology? // *Schizophr. Bull.* - 2011. - V.37. - P.262-271.
243. Kirkpatrick B., Xu L., Cascella N., Ozeki Y., Sawa A., Roberts R.C. DISC1 immunoreactivity at the light and ultrastructural level in the human neocortex. // *J Comp Neurol.* - 2006. - V.497(3). - P.436-450.
244. Kjeldsen L. Johnsen A.H., Sengelov H., Borregaard N. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - V.268. - P.10425-10432.

245. Koenig J.I., Schizophrenia: a unique translational opportunity in behavioral neuroendocrinology. // *Horm. Behav.* - 2006. - V.50. P.602-611.
246. Koike S., Bundo M., Iwamoto K., Suga M., Kuwabara H., Ohashi Y., Shinoda K., Takano Y., Iwashiro N., Satomura Y., Nagai T., Natsubori T., Tada M., Yamasue H., Kasai K. A snapshot of plasma metabolites in first-episode schizophrenia: a capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry study. // *Transl. Psychiatry.* - 2014. - V.4. - e379.
247. Konarski J.Z., McIntyre R.S., Grupp L.A., Kennedy S.H. Is the cerebellum relevant in the circuitry of neuropsychiatric disorders? // *J. Psychiatry Neurosci.* - 2005. - V.30. - P.178-186.
248. Konradi C., Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. // *Pharmacol. Ther.* - 2003. - V.97. - P.153-179.
249. Koros E., Dorner-Ciossek C. The role of glycogen synthase kinase-3b in schizophrenia. // *Drug News Perspect.* - 2007. - V.20. - P.437-445.
250. Korotkova T., Fuchs E. C., Ponomarenko A., von Engelhardt J., Monyer H. NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory. // *Neuron.* - 2010. - V.68. - P.557-569.
251. Kovalenko S., Bergmann A., Schneider-Axmann T., Ovary I., Majtenyi K., Havas L., Honer W.G., Bogerts B., Falkai P. Regio entorhinalis in schizophrenia: more evidence for migrational disturbances and suggestions for a new biological hypothesis. // *Pharmacopsychiatry.* - 2003. - V.36(Suppl 3). - P.S158-S161.
252. Krystal J.H., Karper L.P., Seibyl J.P., Freeman G.K., Delaney R., Bremner J.D., Heninger G.R., Bowers M.B. Jr., Charney D.S. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. // *Arch. Gen. Psychiatry.* - 1994. - V.51. - P.199-214.
253. Kubicki M., McCarley R., Westin C.F., Park H.J., Maier S., Kikinis R., Jolesz F.A., Shenton M.E. A review of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia. // *J. Psychiatr. Res.* - 2007. - V.41. - P.15-30.
254. Kubo K., Tomita K., Uto A., Kuroda K., Seshadri S., Cohen J., Kaibuchi K., Kamiya A., Nakajima K. Migration defects by DISC1 knockdown in C57BL/6,129X1/SvJ, and ICR strains via in utero gene transfer and virus-mediated RNAi. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2010. - V.400. - P.631-637.

255. Kuroda K., Yamada S., Tanaka M., Iizuka M., Yano H., Mori D., Tsuboi D., Nishioka T., Namba T., Iizuka Y., Kubota S., Nagai T., Ibi D., Wang R., Enomoto A., Isotani-Sakakibara M., Asai N., Kimura K., Kiyonari H., Abe T., Mizoguchi A., Sokabe M., Takahashi M., Yamada K., Kaibuchi K. Behavioral alterations associated with targeted disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene in the mouse. // *Hum. Mol. Genet.* - 2011. - V.20. - P.4666-4683.
256. Lahti A.C., Weiler M.A., Tamara Michaelidis BA, Parwani A., Tamminga C.A. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. // *Neuropsychopharmacology.* - 2001. - V.25. - P.455-467.
257. Lambe E.K., Krimer L.S., Goldman-Rakic P.S. Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. // *J. Neurosci.* - 2000. - V.20. - P.8780-8787.
258. Lambert M., Niehaus V., Correll C. Pharmacotherapy in Children and Adolescents at Clinical-High Risk for Psychosis and Bipolar Disorder. // *Pharmacopsychiatry.* – 2016. –V. 49(6). – P.229-244.
259. Lapiz M.D., Fulford A., Muchimapura S., Mason R., Parker T., Marsden C.A. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. // *Neurosci. Behav. Physiol.* - 2003. - V.33. - P.13-29.
260. Laruelle M. Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions. // *Curr. Opin. Pharmacol.* - 2014. - V.14. - P.97-102.
261. Laruelle M., Abi-Dargham A., van Dyck C.H., Gil R., D'Souza C.D., Erdos J., McCance E., Rosenblatt W., Fingado C., Zoghbi S.S., Baldwin R.R., Seibyl J.P., Krystal J.H., Charney D.S., Innis R.B. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1996. - V.93. - P.9235-9240.
262. Lavoie J., Sawa A., Ishizuka K. Application of olfactory tissue and its neural progenitors to schizophrenia and psychiatric research. // *Curr. Opin. Psychiatry.* - 2017. - V.30(3). - P.176-183.
263. Lawrie S.M., Abukmeil S.S. Brain abnormality in schizophrenia - a systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. // *Br. J. Psychiatry.* - 1998. - V.172. - P.110-120.
264. Lawrie S.M., McIntosh A.M., Hall J., Owens D.G., Johnstone E.C. Brain structure and function changes during the development of schizophrenia: the evidence from studies of subjects at increased genetic risk. // *Schizophr. Bull.* - 2008. - V.34. - P.330-340.

265. Le Pen G., Gourevitch R., Hazane F., Hoareau C., Jay T.M., Krebs M.O. Peripubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat. // *Neuroscience*. - 2006. - V.143. - P.395-405.
266. Le Pen G., Grottick A.J., Higgins G.A., Martin J.R., Jenck F., Moreau J.L. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. // *Behav. Pharmacol.* - 2000. - V.11. - P.257-268.
267. Lee F.H., Fadel M.P., Preston-Maher K., Cordes S.P., Clapcote S.J., Price D.J., Roder J.C., Wong A.H. Disc1 point mutations in mice affect development of the cerebral cortex. // *J. Neurosci.* - 2011. - V.31(9). - P.3197-3206.
268. Lee F.H., Zai C.C., Cordes S.P., Roder J.C., Wong A.H. Abnormal interneuron development in disrupted-in-schizophrenia-1 L100P mutant mice. // *Mol. Brain*. - 2013. - 6:20.- doi:10.1186/1756-6606-6-20.
269. Lee S., Park J.Y., Lee W.H., Kim H., Park H.C., Mori K., Suk K. Lipocalin-2 is an autocrine mediator of reactive astrocytosis. // *J. Neurosci.* - 2009. - V.29. - P.234-249.
270. Lee S.H., DeCandia T.R., Ripke S., Yang J., Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study Consortium (PGC-SCZ), International Schizophrenia Consortium (ISC), Molecular Genetics of Schizophrenia Collaboration (MGS), Sullivan P.F., Goddard M.E., Keller M.C., Visscher P.M., Wray N.R. Estimating the proportion of variation in susceptibility to schizophrenia captured by common SNPs. // *Nat. Genet.* - 2012. - V.44. - P.247-250.
271. Le-Niculescu H., Levey D.F., Ayalew M., Palmer L., Gavrin L.M., Jain N., Winiger E., Bhosrekar S., Shankar G., Radel M., Bellanger E., Duckworth H., Olesek K., Vergo J., Schweitzer R., Yard M., Ballew A., Shekhar A., Sandusky G.E., Schork N.J., Kurian S.M., Salomon D.R., Niculescu A.B. 3rd Discovery and validation of blood biomarkers for suicidality. // *Mol. Psychiatry*. - 2013. - V.18. - P.1249-1264.
272. Lesh T.A., Niendam T.A., Minzenberg M.J., Carter C.S. Cognitive control deficits in schizophrenia: mechanisms and meaning. // *Neuropsychopharmacology*. - 2011. - V.36. - P.316-338.
273. Lesko L.J., Atkinson A.J. Jr. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: criteria, validation, strategies. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2001. - V.41. - P.347-66.
274. Levine M.S., Li Z., Cepeda C., Cromwell H.C., Altemus K.L. Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. // *Synapse*. - 1996. - V.24. - P.65-78.

275. Lewis C.M., Levinson D.F., Wise L.H., DeLisi L.E., Straub R.E., Hovatta I., Williams N.M., Schwab S.G., Pulver A.E., Faraone S.V., Brzustowicz L.M., Kaufmann C.A., Garver D.L., Gurling H.M., Lindholm E., Coon H., Moises H.W., Byerley W., Shaw S.H., Mesen A., Sherrington R., O'Neill F.A., Walsh D., Kendler K.S., Ekelund J., Paunio T., Lönnqvist J., Peltonen L., O'Donovan M.C., Owen M.J., Wildenauer D.B., Maier W., Nestadt G., Blouin J.L., Antonarakis S.E., Mowry B.J., Silverman J.M., Crowe R.R., Cloninger C.R., Tsuang M.T., Malaspina D., Harkavy-Friedman J.M., Svrakic D.M., Bassett A.S., Holcomb J., Kalsi G., McQuillin A., Brynjolfson J., Sigmundsson T., Petursson H., Jazin E., Zoëga T., Helgason T. Genome scan meta-analysis of schizophrenia and bipolar disorder, part II: Schizophrenia. // *Am. J. Hum. Genet.* - 2003. - V.73. - P.34-48.
276. Lewis D.A., Hashimoto T., Volk D.W. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2005. - V.6, - P.312-324.
277. Lewis D.A., Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2002. - V.25. - P.409-432.
278. Lewis D.A., Sweet R.A. Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies. // *J. Clin. Invest.* - 2009. - V.119. - P.706-716.
279. Lewis S.W., Murray R.M., Obstetric complications, neurodevelopmental deviance, and risk of schizophrenia. // *J. Psychiatr. Res.* - 1987. - V.2. - P.413-421.
280. Li Q., Cheung C., Wei R., Cheung V., Hui E.S., You Y., Wong P., Chua S.E., McAlonan G.M., Wu E.X. Voxel-based analysis of postnatal white matter microstructure in mice exposed to immune challenge in early or late pregnancy. // *Neuroimage.* - 2010. - V.52. - P.1-8.
281. Li W., Zhou Y., Jentsch J.D., Brown R.A., Tian X., Ehninger D., Hennah W., Peltonen L., Lönnqvist J., Huttunen M.O., Kaprio J., Trachtenberg J.T., Silva A.J., Cannon T.D. Specific developmental disruption of disrupted-in-schizophrenia-1 function results in schizophrenia-related phenotypes in mice. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2007. - V.104. - P.18280-18285.
282. Lichtenstein P., Yip B.H., Bjork C., Pawitan Y., Cannon T.D., Sullivan P.F., Hultman C.M. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. // *Lancet.* - 2009. - V.373. - P.234-239.
283. Lin S.M., Du P., Huber W., Kibbe W.A. Model-based variance-stabilizing transformation for Illumina microarray data. // *Nucleic Acids Res.* - 2008. - V.36. - e11.

284. Lipina T., Labrie L., Weiner I., Roder J. Modulators of the glycine site on NMDA receptors, D-serine and ALX 5407, display similar beneficial effects to clozapine in mouse models of schizophrenia. // *Psychopharmacology (Berl.)*. - 2005. - V.179. - P.54-67.
285. Lipina T., Roder J.C. A new model of the disrupted latent inhibition in C57BL/6J mice after treatment with bupropion. // *Psychopharmacology*. - 2010. - V.208. - P.487-498.
286. Lipina T.V., Kaidanovich-Beilin O., Patel S., Wang M., Clapcote S.J., Liu F., Woodgett J.R., Roder J.C. Genetic and pharmacological evidence for schizophrenia-related Disc1 interaction with GSK-3. // *Synapse*. - 2011. - V.65(3). - P.234-248.
287. Lipina T.V., Fletcher P.J., Lee F.H., Wong A.H., Roder J.C., Disrupted-in-schizophrenia-1 Gln31Leu polymorphism results in social anhedonia associated with monoaminergic imbalance and reduction of CREB and β -arrestin-1,2 in the nucleus accumbens in a mouse model of depression. // *Neuropsychopharmacology*. - 2013a. - V.38. - P.423-436.
288. Lipina T.V., Palomo V., Gil C., Martinez A., Roder J.C. Dual inhibitor of PDE7 and GSK-3-VP1.15 acts as antipsychotic and cognitive enhancer in C57BL/6J mice. // *Neuropharmacology*. - 2013b. - V.64. - P.205-214.
289. Lipina T.V., Zai C., Hlousek D., Roder J.C., Wong A.H. Maternal immune activation during gestation interacts with Disc1 point mutation to exacerbate schizophrenia-related behaviors in mice. // *J. Neurosci.* - 2013c. - V.33(18). - P.7654-66.
290. Lipina T.V., Haque F.N., McGirr A., Boutros P.C., Berger T., Mak T.W., Roder J.C., Wong A.H. Prophylactic valproic acid treatment prevents schizophrenia-related behaviour in Disc1-L100P mutant mice. // *PLOS One*. - 2012. - V.7(12). - e51562.
291. Lipina T.V., Niwa M., Jaaro-Peled H., Fletcher P.J., Seeman P., Sawa A., Roder J.C. Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. // *Genes Brain Behav.* - 2010. - V.9. - P.777-789.
292. Lipina T.V., Wang M., Liu F., Roder J.C. Synergistic interactions between PDE4B and GSK-3: DISC1 mutant mice. // *Neuropharmacology*. - 2012. - V.62(3). - P.1252-62.
293. Lipska B.K. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. // *Rev. Psychiatry Neurosci.* - 2004. - V.29. - P.282-286.
294. Lipska B.K., Lerman D.N., Khaing Z.Z., Weickert C.S., Weinberger D.R. Gene expression in dopamine and GABA systems in an animal model of schizophrenia: effects of antipsychotic drugs. // *Eur. J. Neurosci.* - 2003. - V.18. - P.391-402.

295. Lipska B.K., Peters T., Hyde T.M., Halim N., Horowitz C., Mitkus S., Weickert C.S., Matsumoto M., Sawa A., Straub R.E., Vakkalanka R., Herman M.M., Weinberger D.R., Kleinman J.E., Expression of DISC1 binding partners is reduced in schizophrenia and associated with DISC1 SNPs. // *Hum. Mol. Genet.* - 2006. - V.15(8). - P.1245-1258.
296. Lipska B.K., Weinberger D.R. Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviours in the rat. // *Brain Res. Dev. Brain Res.* - 1993. - V.75. - P.213-222.
297. Lipska B.K., Weinberger D.R. Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. // *Neuropsychopharmacology.* - 1994. - V.10. - P.199-205.
298. Lipska B.K., Weinberger D.R. To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia as a reality test. // *Neuropsychopharmacology.* - 2000. - V.23. - P.223-239.
299. Lisman J.E., Coyle J.T., Green R.W., Javitt D.C., Benes F.M., Heckers S., Grace A.A. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. // *Trends Neurosci.* - 2008. - V.31. - P.234-242.
300. Liu M.F., Jin T., Shen J.H., Shen Z.Y., Zheng Z.C., Zhang Z.L., Xu L.Y., Li E.M., Xu H.X. NGAL and NGALR are frequently overexpressed in human gliomas and are associated with clinical prognosis. // *J Neurooncol.* - 2011. - V.104(1). - P.119-127.
301. Lovestone S., Boada M., Dubois B., Hüll M., Rinne J.O., Huppertz H.J., Calero M., Andrés M.V., Gómez-Carrillo B., León T., del Ser T., ARGO investigators. A phase II trial of tideglusib in Alzheimer's disease. // *J. Alzheimers Dis.* - 2015. - V.45(1). - P.75-88.
302. Lovestone S., Killick R., Di Forti M., Murray R. Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. // *Trends Neurosci.* - 2007. - V.30. - P.142-149.
303. Lu W., Wolf M.E. Repeated amphetamine administration alters AMPA receptor subunit expression in rat nucleus accumbens and medial prefrontal cortex. // *Synapse.* - 1999. - V.32. - P.119-131.
304. Lucock M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. // *Mol. Genet. Metab.* - 2000. - V.71. - P.121-138.
305. Lyon G.J., Abi-Dargham A., Moore H., Lieberman J.A., Javitch J.A., Sulzer D. Presynaptic regulation of dopamine transmission in schizophrenia. // *Schizophr. Bull.* - 2011. - V.37. - P.108-117.
306. Ma L., Liu Y., Ky B., Shughrue P.J., Austin C.P., Morris J.A. Cloning and characterization of Disc1, the mouse ortholog of DISC1 (Disrupted-in-Schizophrenia 1). // *Genomics.* - 2002. - V.80(6). - P.662-672.

307. Ma T.M., Abazyan S., Abazyan B., Nomura J., Yang C., Seshadri S., Sawa A., Snyder S.H., Pletnikov M.V. Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via d-serine depletion. // *Mol. Psychiatry*. - 2013. - V.18. - P.557-567.
308. Maden M. Role and distribution of retinoic acid during CNS development. // *Int. Rev. Cytol.* - 2001. - V.209. - P.1-77.
309. Maher B.J., Loturco J.J. Disrupted-in-schizophrenia (DISC1) functions presynaptically at glutamatergic synapses. // *PLOS One*. - 2012. - V.7. - e34053.
310. Malaspina D., Corcoran C., Kleinhaus K.R., Perrin M.C., Fennig S., Nahon D., Friedlander Y., Harlap S. Acute maternal stress in pregnancy and schizophrenia in offspring: a cohort prospective study. // *BMC Psychiatry*. - 2008. - 8:71. - doi:10.1186/1471-244X-8-71.
311. Mamdani F., Martin M.V, Lencz T., Rollins B., Robinson D.G., Moon E.A., Malhotra A.K., Vawter M.P. Coding and noncoding gene expression biomarkers in mood disorders and schizophrenia. // *Dis. Markers*. - 2013. - V.35. - P.11-21.
312. Mansbach R.S., Geyer M.A. Effects of phencyclidine and phencyclidine biologs on sensorimotor gating in the rat. // *Neuropsychopharmacology*. - 1989. - V.2. - P.299-308.
313. Mao Y., Ge X., Frank C.L., Madison J.M., Koehler A.N., Doud M.K., Tassa C., Berry E.M., Soda T., Singh K.K., Biechele T., Petryshen T.L., Moon R.T., Haggarty S.J., Tsai L.H. Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3beta/beta-catenin signaling. // *Cell*. - 2009. - V.136. - P.1017-1031.
314. Maqbool M., Mobashir M., Hoda N. Pivotal role of glycogen synthase kinase-3: A therapeutic target for Alzheimer's disease. // *Eur. J. Med. Chem.* - 2016. - V.107. - P.63-81.
315. Marin O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. // *Nat. Rev. Neurosci.* - 2012. - V.13. - P.107-120.
316. Martinez V., Sarter M. Detection of the moderately beneficial cognitive effects of low-dose treatment with haloperidol or clozapine in an animal model of the attentional impairments of schizophrenia. // *Neuropsychopharmacology*. - 2008. - V.33. - P.2635-2647.
317. Mathieson I., Munafo M.R., Flint J. Meta-analysis indicates that common variants at the DISC1 locus are not associated with schizophrenia. // *Mol. Psychiatry*. - 2012. - V.17. - P.634-641.

318. Matthyse S. Antipsychotic drug actions: a clue to the neuropathology of schizophrenia? // *Fed. Proc.* - 1973. - V.32. - P.200-205.
319. McDonald W.M., Sibley D.R., Kilpatrick B.F., Caron M.G. Dopaminergic inhibition of adenylate cyclase correlates with high affinity agonist binding to anterior pituitary D2 dopamine receptors. // *Mol. Cell. Endocrinol.* - 1984. - V.36. - P.201-209.
320. McGrath J. Hypothesis: is low prenatal vitamin D a risk-modifying factor for schizophrenia? // *Schizophr. Res.* - 1999. - V.40. - P.173-177.
321. McGrath J.J., Burne T.H., Feron F., Mackay-Sim A., Eyles D.W. Developmental vitamin D deficiency and risk of schizophrenia: a 10-year update. // *Schizophr. Bull.* - 2010. - V.36. - P.1073-1078.
322. McIntosh A.M., Baig B.J., Hall J., Job D., Whalley H.C., Lymer G.K., Moorhead T.W., Owens D.G., Miller P., Porteous D., Lawrie S.M., Johnstone E.C. Relationship of catechol-O-methyltransferase variants to brain structure and function in a population at high risk of psychosis. // *Biol. Psychiatry.* - 2007. - V.61(10). - P.1127-1134.
323. McKetin R., McLaren J., Lubman D.I., Hides L. The prevalence of psychotic symptoms among methamphetamine users. // *Addiction.* - 2006. - V.101. - P.1473-1478.
324. McNeil T.F., Cantor-Graae E., Ismail B. Obstetric complications and congenital malformation in schizophrenia. // *Brain Res. Brain Res. Rev.* - 2000. - V.31. - P.166-178.
325. Mesbah-Oskui L., Georgiou J., Roder J.C. Hippocampal place cell and inhibitory neuron activity in Disrupted-in-schizophrenia-1 mutant mice: implications for working memory deficits. // *NPJ Schizophr.* - 2015. - 1:15001. - doi:10.1038/npjSchz.2015.11.
326. Meyer J.M., Davis V.G., Goff D.C., McEvoy J.P., Nasrallah H.A., Davis S.M., Rosenheck R.A., Daumit G.L., Hsiao J., Swartz M.S., Stroup T.S., Lieberman J.A. Change in metabolic syndrome parameters with antipsychotic treatment in the CATIE Schizophrenia Trial: Prospective data from phase 1. // *Schizophr. Res.* - 2008. - V.101. - P.273-286.
327. Meyer U., Feldon J. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. // *Prog. Neurobiology.* - 2010. - V.90. - P.285-326.
328. Meyer U., Feldon J., Fatemi S.H. In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2009. - V.33. - P.1061-1079.
329. Meyer U., Feldon J., Schedlowski M., Yee B.K. Towards an immunoprecipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2005. - V.29. - P.913-947.

330. Millar J.K., Pickard B.S., Mackie S., James R., Christie S., Buchanan S.R., Malloy M.P., Chubb J.E., Huston E., Baillie G.S., Thomson P.A., Hill E.V., Brandon N.J., Rain J.C., Camargo L.M., Whiting P.J., Houslay M.D., Blackwood D.H., Muir W.J., Porteous D.J. DISC1 and PDE4B are interacting genetic factors in schizophrenia that regulate cAMP signaling. // *Science*. - 2005. - V.310. - P.1187-1191.
331. Millar J.K., Wilson-Annan J.C., Anderson S., Christie S., Taylor M.S., Semple C.A., Devon R.S., Clair D.M., Muir W.J., Blackwood D.H., Porteous D.J. Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia. // *Hum. Mol. Genet.* - 2000. - V.9(9). - P.1415-1423.
332. Miller E.K., Cohen J. D. An integrative theory of prefrontal cortex function. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2001. - V.24. - P.167-202.
333. Miller E.K., Cohen J.D. An integrative theory of prefrontal cortex function. // *Annu. Rev. Neurosci.* - 2001. - V.24. - P.167-202.
334. Missale C., Nash S.R., Robinson S.W., Jaber M., Caron M.G. Dopamine receptors: from structure to function. // *Physiol. Rev.* - 1998. - V.78. - P.189-225.
335. Mittal V.A., Ellman L.M., Cannon T.D. Gene-environment interaction and covariation in schizophrenia: the role of obstetric complications. // *Schizophr. Bull.* - 2008. - V.34(6). - P.1083-1094.
336. Miyakawa T., Leiter L.M., Gerber D.J., Gainetdinov R.R., Sotnikova T.D., Zeng H., Caron M.G., Tonegawa S. Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2003. - V.100.- P.8987-8992.
337. Miyoshi K., Asanuma M., Miyazaki I., Diaz-Corrales F.J., Katayama T., Tohyama M., Ogawa N. DISC1 localizes to the centrosome by binding to kendrin. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2004. - V.317(4). - P.1195-1199.
338. Miyoshi K., Honda A., Baba K., Taniguchi M., Oono K., Fujita T., Kuroda S., Katayama T., Tohyama M. Disrupted-In-Schizophrenia 1, a candidate gene for schizophrenia, participates in neurite outgrowth. // *Mol. Psychiatry.* - 2003. - V.8. - P.685-694.
339. Mizrahi R., Addington J., Rusjan P.M., Suridjan I., Ng A., Boileau I., Pruessner J.C., Remington G., Houle S., Wilson A.A. Increased stress-induced dopamine release in psychosis. // *Biol. Psychiatry.* - 2012. - V.71. - P.561-567.
340. Moens L.N., De Rijk P., Reumers J., Van den Bossche M.J., Glasse W., De Zutter S. et al. Sequencing of DISC1 pathway genes reveals increased burden of rare

- missense variants in schizophrenia patients from a northern Swedish population. // PLOS One. - 2011. -V. 6. - e23450.
341. Moghaddam B., Adams B.W. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. // Science. - 1998. - V.281. - P.1349-1352.
342. Mohn A.R., Gainetdinov R.R., Caron M.G., Koller B.H. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. // Cell. - 1999. - V.98. - 427-436.
343. Monti B., Polazzi E., Contestabile A. Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection. // Curr. Mol. Pharmacol. - 2009. - V.2. - P.95-109.
344. Moore H., Jentsch J.D., Ghajarnia M., Geyer M.A., Grace A.A. A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. // Biol. Psychiatry. - 2006. - V.60. - P.253-264.
345. Moore T.H., Zammit S., Lingford-Hughes A. Barnes T.R., Jones P.B., Burke M., Lewis G. Cannabis use and risk of psychotic or affective mental health outcomes: a systematic review. // Lancet. - 2007. - V.370. - P.319-328.
346. Mortensen P.B., C.B. Pedersen, T. Westergaard Wohlfahrt J., Ewald H., Mors O., Andersen P.K., Melbye M. Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia. // New England Journal of Medicine. – 2007. – V. 340. –P. 603–608.
347. Mouchlianitis E., McCutcheon R., Howes O.D. Brain-imaging studies of treatment-resistant schizophrenia: a systematic review. // Lancet Psychiatry. – 2016. –V. 3(5). –P. 451-63.
348. Muneer A. Wnt and GSK3 Signaling Pathways in Bipolar Disorder: Clinical and Therapeutic Implications. // Clin Psychopharmacol Neurosci. – 2017. – V.15(2). –P. 100-114.
349. Muñoz-Estrada J., Benítez-King G., Berlanga C., Meza I. Altered subcellular distribution of the 75-kDa DISC1 isoform, cAMP accumulation, and decreased neuronal migration in schizophrenia and bipolar disorder: implications for neurodevelopment. // CNS Neurosci Ther. – 2015.- V. 21(5). –P. 446-53.
350. Murai R., Noda Y., Matsui K., Kamei H., Mouri A., Matsuba K. Hypofunctional glutamatergic neurotransmission in the prefrontal cortex is involved in the emotional

- deficit induced by repeated treatment with phencyclidine in mice: implications for abnormalities of glutamate release and NMDA-CaMKII signaling. // *Behav Brain Res.* – 2007. - V.180. –P. 152–160.
351. Murdoch, H., Mackie S., Collins D.M., Hill E.V., Bolger G.B., Klussmann E., Porteous D.J., Millar J.K., Houslay M.D. Isoform-selective susceptibility of DISC1/phosphodiesterase-4 complexes to dissociation by elevated intracellular cAMP levels. // *J. Neurosci.* - 2007. - V.27. –P. 9513–9524.
352. Munroe S.H., Zhu J. Overlapping transcripts, double-stranded RNA and antisense regulation: a genomic perspective. // *Cell Mol Life Sci.* – 2006. – V. 63 (18). –P. 2102-2118.
353. Nakai T., Nagai T., Wang R., Yamada S., Kuroda K., Kaibuchi K., Yamada K. Alterations of GABAergic and dopaminergic systems in mutant mice with disruption of exons 2 and 3 of the *Disc1* gene. // *Neurochem Int.* – 2014. – V. 74. –P. 74–83.
354. Nakata K., Lipska B.K., Hyde T.M., Ye T., Newburn E.N., Morita Y., Vakkalanka R., Barenboim M., Sei Y., Weinberger D.R., Kleinman J.E., DISC1 splice variants are upregulated in schizophrenia and associated with risk polymorphisms. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. –V. 106 (37). –P. 15873-15878.
355. Nakazawa K. Zsiros V., Jiang Z., Nakao K., Kolata S., Zhang S., Belforte J.E. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. // *Neuropharmacology.* – 2012. – V. 62(3). –P. 1574-1583.
356. Namba T., Ming G.L., Song H., Waga C., Enomoto A., Kaibuchi K., Kohsaka S., Uchino S. NMDA receptor regulates migration of newly generated neurons in the adult hippocampus via Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1). // *J. Neurochem.* – 2011. – V. 118. –P. 34–44.
357. Nascimento J.M., Martins-de-Souza D. The proteome of schizophrenia. // *Npj Schizophr.* – 2015. – V. 1. –P. 14003.
358. Naudé P.J., Dekker A.D., Coppus A.M., Vermeiren Y., Eisel U.L., van Duijn C.M., Van Dam D., De Deyn P.P. Serum NGAL is Associated with Distinct Plasma Amyloid- β Peptides According to the Clinical Diagnosis of Dementia in Down Syndrome. // *J Alzheimers Dis.* – 2015. – V. 45(3). –P. 733-43.
359. Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium. Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. // *Nature Neurosci.* – 2015. – V. 18. –P. 199–209.
360. Niculescu A.B. Schizophrenia: from genetics to biology to predictive medicine. // *J. Clin. Psychiatry.* – 2014. – V. 75(2). –P. 4–7.

361. Nishi A., Kuroiwa M., Miller D.B., O'Callaghan J.P., Bateup H.S., Shuto T., Sotogaku N., Fukuda T., Heintz N., Greengard P., Snyder G.L. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. // *J Neurosci.* – 2008. – V. 28. –P. 10460–10471.
362. Niwa M., Kamiya A., Murai R., Kubo K., Gruber A.J., Tomita K., Lu L., Tomisato S., Jaaro-Peled H., Seshadri S., Hiyama H., Huang B., Kohda K., Noda Y., O'Donnell P., Nakajima K., Sawa A., Nabeshima T. Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. // *Neuron.* – 2010. – V. 65. –P. 480–489.
363. Niwa M., Jaaro-Peled H., Tankou S., Seshadri S., Hikida T., Matsumoto Y., Cascella N.G., Kano S., Ozaki N., Nabeshima T., Sawa A. Adolescent stress-induced epigenetic control of dopaminergic neurons via glucocorticoids. // *Science.* – 2013. – V. 339. –P. 335–339.
364. Nkam I., Ramoz N., Breton F., Mallet J., Gorwood P., Dubertret C. Impact of DRD2/ANKK1 and COMT Polymorphisms on Attention and Cognitive Functions in Schizophrenia. // *PLoS One.* - 2017. – V. 12(1). –P. e0170147.
365. Nyirenda M.J., Seckl J.R. Intrauterine events and the programming of adulthood disease: the role of fetal glucocorticoid exposure. // *Int. J. Mol. Med.* – 1998. - V. 2. –P. 607–614.
366. Noto C.S., Gadelha A., Belangero S.I., Smith M.A.C., de Aguiar B.W., Panizzuti B., Mari J. de J., Gama C.S., Bressan R.A., Brietzke E. Association of biomarkers and depressive symptoms in schizophrenia. // *Neurosci. Lett.* – 2011. - V. 505. –P. 282–285.
367. Numata S., Ueno S., Iga J., Song H., Nakataki M., Tayoshi S., Sumitani S., Tomotake M., Itakura M., Sano A., Ohmori T. Positive association of the PDE4B (phosphodiesterase 4B) gene with schizophrenia in the Japanese population. // *J. Psychiatr. Res.* – 2008. – V. 43. –P. 7e12.
368. O'Callaghan E., Gibson T., Colohan H.A., Buckley P., Walshe D.G., Larkin C., Waddington J.L. Risk of schizophrenia in adults born after obstetric complications and their association with early onset of illness: a controlled study. // *BMJ.* – 1992. – V. 305. –P. 1256–1259.
369. O'Donovan M. C., N. J. Craddock and M. J. Owen. Genetics of psychosis; insights from views across the genome. // *Hum. Genet.* – 2009. – V. 126. –P. 3-12.
370. Olf M., Frijling J.L., Kubzansky L.D., Bradley B., Ellenbogen M.A., Cardoso C., Bartz J.A., Yee J.R., van Zuiden M. The role of oxytocin in social bonding, stressregulation and mental health: an update on the moderating effects of context and

- interindividual differences. // *Psychoneuroendocrinology*. – 2013. – V. 38. –P. 1883–1894.
371. Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. Systematic functional analysis of the yeast genome. // *Trends Biotechnol.* – 1998. – V. 16. –P. 373–378.
372. Olney J. W. and Farber N. B.. NMDA antagonists as neurotherapeutic drugs, psychotogens, neurotoxins, and research tools for studying schizophrenia. // *Neuropsychopharmacology*. – 1995. – V. 13. –P. 335-345.
373. Olton D.S., Papas B.C. Spatial memory and hippocampal function. // *Neuropsychologia*. – 1979. – V. 17. –P. 669–682.
374. O'Neill M.F., Shaw G. Comparison of dopamine receptor antagonists on hyperlocomotion induced by cocaine, amphetamine, MK-801 and the dopamine D1 agonist C-APB in mice. // *Psychopharmacology (Berl)*. – 1999. – V. 145. –P. 237–250.
375. O'Tuathaigh C., Kirby B., Moran P., Waddington J. Mutant mouse models: genotype–phenotype relationships to negative symptoms in schizophrenia. // *Schizophr Bull.* – 2010. – V. 36. –P. 271–288.
376. O'Tuathaigh C.M., Waddington J.L. Closing the translational gap between mutant mouse models and the clinical reality of psychotic illness. // *Neuroscience and Biobehavioural Reviews*. – 2015. – V. 58. –P. 19-35.
377. Ogawa F., Kasai M., Akiyama T. A functional link between Disrupted-In-Schizophrenia 1 and the eukaryotic translation initiation factor 3. // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2005. – V. 338 (2). –P. 771-776.
378. Opmeer E.M., van Tol M.J., KorteKaas R., van der Wee N.J., Woudstra S., van Buchem M.A., Penninx B.W., Veltman D.J., Aleman A. DISC1 gene and affective psychopathology: a combined structural and functional MRI study. // *J Psychiatr Res.* – 2015. – V. 61. –P.150-7.
379. Ozeki Y., Tomoda T., Kleiderlein J., Kamiya A., Bord L., Fujii K., Okawa M., Yamada N., Hatten M.E., Snyder S.H., Ross C.A., Sawa A. Disrupted-in-Schizophrenia-1 (DISC-1): mutant truncation prevents binding to NudE-like (NUDEL) and inhibits neurite outgrowth. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – V. 100 (1). –P. 289-294.
380. Owen M.J. “Implications of genetic findings for understanding schizophrenia”. // *Schizophrenia Bulletin*. – 2012. – V. 38. –P. 904-907
381. Owen A.M., Roberts A.C., Hodges J.R., Summers B.A., Polkey C.E., Robbins T.W. Contrasting mechanisms of impaired attentional set-shifting in patients with frontal lobe damage or Parkinson's disease. // *Brain*. – 1993. – V. 116(Pt 5). –P. 1159–1175.

382. Pal M., Ebrahimi S., Oh G., Khare T., Zhang A., Kaminsky Z.A., Wang S.C., Petronis A. High Precision DNA Modification Analysis of HCG9 in Major Psychosis. // *Schizophr. Bull.* – 2016. – V. 42. –P. 170–177.
383. Park Y.U., Jeong J., Lee H., Mun J.Y., Kim J.H., Lee J.S., Nguyen M.D., Han S.S., Suh P.G., Park S.K. Disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) plays essential roles in mitochondria in collaboration with Mitofilin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – V. 107. –P.17785–17790.
384. Pascual R., Zamora-Leon S.P., Valero-Cabre A. Effects of postweaning social isolation and re-socialization on the expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) and dendritic development in the medial prefrontal cortex of the rat. // *Acta Neurobiol Exp (Wars).* – 2006. – V. 66. –P. 7–14.
385. Paterlini M., Zakharenko S.S., Lai W.S., Qin J., Zhang H., Mukai J., Westphal K.G., Olivier B., Sulzer D., Pavlidis P., Siegelbaum S.A., Karayiorgou M., Gogos J.A. Transcriptional and behavioral interaction between 22q11.2 orthologs modulates schizophrenia-related phenotypes in mice. *Nat Neurosci.* – 2005. – V. 8. –P. 1586–1594.
386. Paylor R., Crawley J.N. Inbred strain differences in prepulse inhibition of the mouse startle response. // *Psychopharmacology.* – 1997. – V. 132. –P. 169–180.
387. Paulson L., Martin P., Persson A., Nilsson C.L., Ljung E., Westman-Brinkmalm A., Eriksson P.S., Blennow K., Davidsson P. Comparative genome- and proteome analysis of cerebral cortex from MK-801-treated rats. // *J Neurosci Res.* – 2003. –V. 71. – P. 526–533.
388. Peineau S., Nicolas C.S., Bortolotto Z.A., Bhat R.V., Ryves W.J., Harwood A.J., Dournaud P., Fitzjohn S.M., Collingridge G.L. A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor-dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. // *Mol. Brain.* – 2009. – V. 2. –P. 22.
389. Peleg-Raibstein D., Sydekum E., Russig H., Feldon J. Withdrawal from repeated amphetamine administration leads to disruption of prepulse inhibition but not to disruption of latent inhibition. // *J Neural Transm.* - 2006. – V.113. -P. 1323–1336.
390. Perucca E., Tomson T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. // *Lancet Neurol.* – 2011. – V. 10. –P. 446–456.
391. Perry W., Geyer M. A., Braff D.L. Sensorimotor gating and thought disturbance measured in close temporal proximity in schizophrenic patients. // *Archives of General Psychiatry.* – 1999. – V. 56. –P. 277–281.

392. Phiel C.J., Zhang F., Huang E.Y., Guenther M.G., Lazar M.A., Klein P.S. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276. –P. 36734–36741.
393. Pickard B.S., Thomson P.A., Christoforou A., Evans K.L., Morris S.W., Porteous D.J., Blackwood D.H., Muir W.J. The PDE4B gene confers sex-specific protection against schizophrenia. // *Psychiatr Genet.* - 2007. – V. 17. –P. 129e133.
394. Piontkewitz Y., Arad M., Weiner I. Risperidone administered during asymptomatic period of adolescence prevents the emergence of brain structural pathology and behavioral abnormalities in an animal model of schizophrenia. // *Schizophr Bull.* – 2011. – V. 37. –P. 1257–1269.
395. Piontkewitz Y., Arad M., Weiner I. Tracing the development of psychosis and its prevention: what can be learned from animal models. // *Neuropharmacology.* – 2012. – V. 62. –P. 1273–1289.
396. Pletnikov M.V., Ayhan Y., Nikolskaia O., Xu Y., Ovanesov M.V., Huang H., Mori S., Moran T.H., Ross C.A. Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. // *Mol Psychiatry.* -2008. -V.13(2). – P.173-186
397. Pogorelov V.M., Nomura J., Kim J., Kannan G., Ayhan Y., Yang C. Taniguchi Y., Abazyan B., Valentine H., Krasnova I.N., Kamiya A., Cadet J.L., Wong D.F., Pletnikov M.V. Mutant DISC1 affects methamphetamine-induced sensitization and conditioned place preference: a comorbidity model. // *Neuropharmacology.* – 2012. – V. 62. – P. 1242–1251.
398. Pouzet B., Anderson M.P., Hogg S. Effects of acute treatment with antidepressant drugs on sensorimotor gating deficits in rats. // *Psychopharmacology (Berl.).* – 2005. – V. 178. –P. 9–16.
399. Powell S.B., Young J.W., Ong J.C., Caron M.G., Geyer M.A. Atypical antipsychotics clozapine and quetiapine attenuate prepulse inhibition deficits in dopamine transporter knockout mice. // *Behav Pharmacol.* – 2008. – V. 19. –P. 562–565.
400. Powell S. B., Sejnowski T. J., Behrens M. M. Behavioral and neurochemical consequences of cortical oxidative stress on parvalbumin-interneuron maturation in rodent models of schizophrenia. // *Neuropharmacology.* – 2012. – V. 62. –P. 1322-1331.
401. Powell S.B., Weber M., Geyer M.A. Genetic models of sensorimotor gating: relevance to neuropsychiatric disorders. // *Curr Top Behav Neurosci.* – 2012. – V. 12. – P.251-318.

402. Prins J.R., Gomez-Lopez N., Robertson S.A. Interleukin-6 in pregnancy and gestational disorders. // *J Reprod Immunol.* – 2012. – V. 95. –P.1–14.
403. Pruessner J.C., Champagne F., Meaney M.J., Dagher A. Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: a positron emission tomography study using [¹¹C]raclopride. // *J Neurosci.* – 2004. – V. 24. –P. 2825–2831.
404. Purcell S.M., Moran J.L., Fromer M., Ruderfer D., Solovieff N., Roussos P., O'Dushlaine C., Chambert K., Bergen S.E., Kähler A., Duncan L., Stahl E., Genovese G., Fernández E., Collins M.O., Komiyama N.H., Choudhary S., Magnusson P.K., Banks E., Shakir K., Garimella K., Fennell T., DePristo M., Grant S.G., Haggarty S.J., Gabriel S., Scolnick E.M., Lander E.S., Hultman C.M., Sullivan P.F., McCarroll S.A., Sklar P. A polygenic burden of rare disruptive mutations in schizophrenia. // *Nature.* – 2014. – V. 506(7487). –P. 185-90.
405. Pycock C.J., Kerwin R.W., Carter C.J. Effect of lesion of cortical dopamine terminals on subcortical dopamine receptors in rats. // *Nature.* – 1980. – V. 286. –P. 74–76.
406. Qiao H., Noda Y., Kamei H., Nagai T., Furukawa H., Miura H. Kayukawa Y., Ohta T., Nabeshima T. Clozapine, but not haloperidol, reverses social behavior deficit in mice during withdrawal from chronic phencyclidine treatment. // *Neuroreport.* – 2001. – V. 12. –P. 11–15.
407. Rabe-Jabłońska J. Czy schizofrenia jest chorobą neurodegeneracyjną czy neurorozwojową? // *Psychiatr. Psychol. Klin.* – 2005. – V. 5(1). –P. 117–125.
408. Ralph R.J., Paulus M.P., Geyer M.A. Strain-specific effects of amphetamine on prepulse inhibition and patterns of locomotor behavior in mice. // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2001. – V. 298. –P. 148–155.
409. Ray S., Britschgi M., Herbert C., Takeda-Uchimura Y., Boxer A., Blennow K., Friedman L.F., Galasko D.R., Jutel M., Karydas A., Kaye J.A., Leszek J., Miller B.L., Minthon L., Quinn J.F., Rabinovici G.D., Robinson W.H., Sabbagh M.N., So Y.T., Sparks D.L., Tabaton M., Tinklenberg J., Yesavage J.A., Tibshirani R., Wyss-Coray T.. Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. // *Nat. Med.* – 2007. – V. 13. –P. 1359–1362.
410. Rainey J.M. Jr., Crowder M.K. Prolonged psychosis attributed to phencyclidine: report of three cases. // *Am J Psychiatry.* – 1975. – V. 132. –P. 1076–1078.
411. Ramsey A.J., Milenkovic M., Oliveira A.F., Escobedo-Lozoya Y., Seshadri S., Salah-pour A., Sawa A., Yasuda R., Caron M.G. Impaired NMDA receptor transmission

- alters striatal synapses and DISC1 protein in an age-dependent manner. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2011. – V. 108. –P. 5795–5800.
412. Randrup A., Munkvad I. Pharmacology and physiology of stereotyped behavior. // *J Psychiatr Res.* – 1974. – V.11. –P. 1-10.
413. Rasle C., Mazas O., Vaiva G., Tournant M., Raybois O., Goudemand M. [Thomas P.I.](#) Clinical features of latent inhibition in schizophrenia. // *Schizophr Res.* – 2001. – V. 51. –P. 149–161.
414. Robinson T.E., Becker J.B. Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. // *Brain Res.* – 1986. – V. 396. –P. 157–198.
415. Rodvold J.J., Mahadevan N.R., Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: when good immunity goes bad. // *Cancer Lett.* – 2012. – V. 316. –P. 132–138.
416. Romero E., Ali C., Molina-Holgado E., Castellano B., Guaza C., Borrell J. Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. // *Neuropsychopharmacology.* – 2007. – V. 32. –P. 1791–1804.
417. Rosenberg D.R., Lewis D.A. Postnatal maturation of the dopaminergic innervation of monkey prefrontal and motor cortices: a tyrosine hydroxylase immunohistochemical analysis. // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – V. 358. –P. 383–400
418. Robinson T.E., Kolb B. Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. // *Eur J Neurosci.* – 1999. – V. 11. –P. 1598–1604.
419. Rodvold J.J., Mahadevan N.R., Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: when good immunity goes bad. // *Cancer Lett.* – 2012. – V. 316. –P. 132–138.
420. Ross C.A., Margolis R.L., Reading S.A.J., Pletnikov M., Coyle J.T.. Neurobiology of schizophrenia. // *Neuron.* – 2006. – V. 52. –P. 139–153.
421. Rosso I.M., Cannon T.D., Huttunen T., Huttunen M.O., Lonnqvist J., Gasperoni T.L. Obstetric risk factors for early-onset schizophrenia in a Finnish birth cohort. // *Am. J. Psychiatry.* – 2000. – V. 157. –P. 801–807.
422. Ripke S., O'Dushlaine C., Chambert K., et al. Genome-wide association analysis identifies 13 new risk loci for schizophrenia. // *Nat. Genet.* – 2013. – V. 45. –P. 1150-9.
423. Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. I. Multilocus models. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1990. – V. 46. –P., 222.

424. Rodefer J.S., Murphy E.R., Baxter M.G. PDE10A inhibition reverses subchronic PCP-induced deficits in attentional set-shifting in rats. // *Eur J Neurosci.* – 2005. – V. 21. –P. 1070–1076.
425. Rodrigues-Amorim D., Rivera-Baltanás T., López M., Spuch C., Olivares J.M., Agís-Balboa R.C. Schizophrenia: A review of potential biomarkers. // *J Psychiatr Res.* – 2017. – V. 93. –P. 37-49.
426. Ross C.A., Margolis R.L., Reading S.A., Pletnikov M., Coyle J.T. Neurobiology of schizophrenia. // *Neuron.* – 2006. – V. 52. –P. 139–53.
427. Russig H., Durrer A., Yee B.K., Murphy C.A., Feldon J. The acquisition, retention and reversal of spatial learning in the Morris water maze task following withdrawal from an escalating dosage schedule of amphetamine in Wistar rats. // *Neuroscience.* – 2003. –V. 119. –P. 167–179.
428. Salmon J.E. A noninflammatory pathway for pregnancy loss: innate immune activation? // *J Clin Invest.* – 2004. – V. 114. –P. 15–17.
429. Samuelsson A.M., Jennische E., Hansson H.A., Holmång A. Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABA(A) dysregulation and impaired spatial learning. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2006. – V. 290. –P. R1345–R1356.
430. Sams-Dodd F. Phencyclidine-induced stereotyped behavior and social isolation in rats: a possible animal model of schizophrenia. // *Behav Pharmacol.* – 1996. – V.7. –P. 3–23.
431. Sams-Dodd F., Lipska B.K., Weinberger D.R. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. // *Psychopharmacology (Berl).* – 1997. – V. 132. –P. 303–310.
432. Sanders A. R., Duan J., Levinson D. F., Shi J., He D., Hou C., Burrell G.J., Rice J.P., Nertney D.A., Olincy A., Rozic P., Vinogradov S., Buccola N.G., Mowry B.J., Freedman R., Amin F., Black D.W., Silverman J.M., Byerley W.F., Crowe R.R., Cloninger C.R., Martinez M., Gejman P.V. No significant association of 14 candidate genes with schizophrenia in a large European ancestry sample: implications for psychiatric genetics. // *Am. J. Psychiatry.* – 2008. – V. 165(4). –P. 497-506.
433. Sarnyai Z., Guest P.C. Connecting Brain Proteomics with Behavioural Neuroscience in Translational Animal Models of Neuropsychiatric Disorders. // *Adv Exp Med Biol.* – 2017. – V. 974. –P. 97-114.

434. Sasaki S., Shionoya A., Ishida M., Gambello M.J., Yingling J., Wynshaw-Boris A., Hirotsune S. A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. // *Neuron*. – 2000. – V. 28. –P. 681–696.
435. Sawamura N., Sawamura-Yamamoto T., Ozeki Y., Ross C.A., Sawa A. A form of DISC1 enriched in nucleus: altered subcellular distribution in orbitofrontal cortex in psychosis and substance/alcohol abuse. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* - 2005. – V. 102. –P. 1187–1192.
436. Sawamura N., Ando T., Maruyama Y., Fujimuro M., Mochizuki H., Honjo K., Shi-moda M., Toda H., Sawamura-Yamamoto T., Makuch L.A., Hayashi A., Ishizuka K., Cascella N.G., Kamiya A., Ishida N., Tomoda T., Hai T., Furukubo-Tokunaga K., Sawa A. Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly. // *Mol. Psychiatry*. – 2008. – V. 13. –P. 1138–1148.
437. Scatton B., Worms P., Lloyd K.G., Bartholini G. Cortical modulation of striatal function. // *Brain Res.* – 1982. – V. 232. –P. 331–343.
438. Scheggia D., Bebensee A., Weinberger D.R., Papaleo F. The ultimate intra-/extra-dimensional attentional set-shifting task for mice. // *Biol Psychiatry*. – 2014. – V. 75(8). - P. 660-70.
439. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. // *Nature*. – 2014. – V. 511.-P. 421-7.
440. Schmitt A., Turck C.W., Pilz P.K., Malchow B., von Wilmsdorff M., Falkai P., Martins-de-Souza D. Proteomic similarities between heterozygous reeler mice and schizophrenia. // *Biol Psychiatry*. – 2013. – V. 74. –P.e5–e10.
441. Schneider C.W., Chenoweth M.B. Effects of hallucinogenic and other drugs on the nest-building behaviour of mice. // *Nature*. - 1970. – V. 225(5239). –P.1262-1263.
442. Schurov I.L., Handford E.J., Brandon N.J., Whiting, P.J. Expression of disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) protein in the adult and developing mouse brain indicates its role in neurodevelopment. // *Mol Psychiatry*. - 2004. -V.9(12). – P.1100-1110.
443. Schwarz E., Prabakaran S., Whitfield P., Major H., Leweke F.M., Koethe D., McKenna P., Bahn S. High Throughput Lipidomic Profiling of Schizophrenia and Bipolar Disorder Brain Tissue Reveals Alterations of Free Fatty Acids, Phosphatidylcholines, and Ceramides. J. // *Proteome Res.* - 2008. – V. 7. –P. 4266–4277.
444. Seckl J.R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. // *Eur. J. Endocrinol.* – 2004. – V. 151. -P. U49–U62. - (Suppl. 3).

445. Seeman P., Watanabe M., Grigoriadis D., Tedesco J.L., George S.R., Svensson U. Nilsson J.L.G., Neumeier J.L. Dopamine D2 receptor binding sites for agonists. A tetrahedral model. // *Mol Pharmacol.* – 1985. – V. 28. –P. 391–399.
446. Seeman P., Bzowej N.H., Guan H.C., Bergeron C., Reynolds G.P., Bird E.D., Riederer P., Jellinger K., Tourtellotte W.W. Human brain D1 and D2 dopamine receptors in schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases. // *Neuropsychopharmacology.* – 1987. – V. 1(1). -P.5-15.
447. Seeman P., Tallerico T., Ko F. Dopamine displaces [3H]domperidone from high-affinity sites of the dopamine D2 receptor, but not [3H]raclopride or [3H]spiperone in isotonic medium: implications for human positron emission tomography. // *Synapse.* - 2003. – V. 49. –P. 209–215.
448. Seeman P., Weinshenker D., Quirion R., Srivastava L., Bhardwaj S.K., Grandy D.K., Premont R., Sotnikova T., Boksa P., El-Ghundi M., O'Dowd B.F., George S.R., Perreault M.L., Mannisto P.T., Robinson S., Palmiter R.D., Tallerico T. Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – V. 102. –P. 3513–3518.
449. Seeman P., Schwarz J., Chen J.F., Szechtman H., Perreault M., McKnight G.S. Roder J.C., Quirion R., Boksa P., Srivastava L.K., Yanai K., Weinshenker D., Sumiyoshi T. Psychosis pathways converge via D2(high) dopamine receptors. // *Synapse.* – 2006. – V. 60. –P. 319–346.
450. Seeman P. Dopamine agonist radioligand binds to both D2High and D2Low receptors, explaining why alterations in D2High are not detected in human brain scans. // *Synapse.* – 2012. – V. 66(1). –P. 88-93.
451. Semeralul M.O., Boutros P.C., Likhodi O., Okey A.B., Van Tol H.H., et al. Microarray analysis of the developing cortex. // *J Neurobiol.* -2006. – V.66. -P. 1646–1658.
452. Shen S., Lang B., Nakamoto C., Zhang F., Pu J., Kuan S.L., Chatzi C., He S., Mackie I., Brandon N.J., Marquis K.L., Day M., Hurko O., McCaig C.D., Riedel G., St Clair D. Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Disc1. // *J Neurosci.* -2008. -V. 28(43). – P.10893-10904.
453. Shinoda T., Taya S., Tsuboi D., Hikita T., Matsuzawa R., Kuroda S., Iwamatsu A., Kaibuchi K. DISC1 regulates neurotrophin-induced axon elongation via interaction with Grb2. // *J. Neurosci.* -2007. -V.27. -P. 4–14.

454. Shoblock J.R., Maisonneuve I.M., Glick S.D. Differences between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats: working memory, tolerance, and extinction. // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2003. -V.170. -P.150–156.
455. Shoval G., Weizman A. The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. // *Eur Neuropsychopharmacol*. - 2005. -V.15. -P.319–329.
456. Singer P., Feldon J., Yee B.K. Are DBA/2 mice associated with schizophrenia-like endophenotypes? A behavioral contrast with C57BL/6J mice. // *Psychopharmacology*. – 2009. -V. 206. -P. 677–698.
457. Singh K.K., De Rienzo G., Drane L., Mao Y., Flood Z., Madison J., Ferreira M., Bergen S., King C., Sklar P., Sive H., Tsai L.H. Common DISC1 polymorphisms disrupt Wnt/GSK3beta signaling and brain development. // *Neuron*. -2011. -V.72 (4). -P.545-558.
458. Smith S.E., Li J., Garbett K., Mirnics K., Patterson P.H. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. // *J Neurosci*. -2007. -V. 27. -P.10695–10702.
459. Snyder S.H. Dopamine receptor excess and mouse madness. // *Neuron*. -2006. -V.49. -P.484–485.
460. Soares D.C., Carlyle B.C., Bradshaw N.J., Porteous D.J. DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness. // *ACS Chem Neurosci*. - 2011. – V.2 (11). -P.609-632.
461. Soda T., Frank C., Ishizuka K., Baccarella A., Park Y.U., Flood Z., Park S.K., Sawa A., Tsai L.H. DISC1-ATF4 transcriptional repression complex:dual regulation of the cAMP-PDE4 cascade by DISC1. // *Mol. Psychiatry*. -2013. -V.18(8). – P.898-908.
462. Song W, Li W, Feng J, Heston LL, Scaringe WA, Sommer SS. Identification of high risk DISC1 structural variants with a 2% attributable risk for schizophrenia. // *Biochem Biophys Res Commun*. -2008. -V.367. -P.700–706.
463. Song W., Li W., Noltner K., Yan J., Green E., Grozeva D. et al. Identification of high risk DISC1 protein structural variants in patients with bipolar spectrum disorder. // *Neurosci Lett*. -2010. -V.486. -P.136–140.
464. Song X., Li X., Gao J., Zhao J., Li Y., Fan X., Lv L. APOA-I: A possible novel biomarker for metabolic side effects in first episode schizophrenia. // *PLoS One*. - 2014. -V.9. -P.e93902.
465. Sowell E.R., et al. In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. // *Nat. Neurosci*. -1999. -V.2. -P.859–861

466. Steinecke A., Gampe C., Valkova C., Kaether C., Bolz J. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons. // *J. Neurosci.* - 2012.- V.32. -P.738–745.
467. Spano M.S., Fadda P., Frau R., Fattore L., Fratta W. Cannabinoid self-administration attenuates PCP-induced schizophrenia-like symptoms in adult rats. // *Eur Neuropsychopharmacol.* - 2010. -V20. -P. 25–36.
468. Stefani M.R., Moghaddam B. Systemic and prefrontal cortical NMDA receptor blockade differentially affect discrimination learning and set-shift ability in rats. // *Behav Neurosci.* – 2005. -V.119. -P.420–428.
469. Stevens B. et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. // *Cell.* -2007.-V.131. -P.1164–1178.
470. Strauss M. E., Buchanan R. W., Hale J. Relations between attentional deficits and clinical symptoms in schizophrenic outpatients. // *Psychiatry Research.* -1993. V.47. - P.205–213.
471. Sohal V. S., Zhang F., Yizhar O., Deisseroth K. Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. // *Nature.* -2009. V.459. -P.698-702
472. Starr M. S. Glutamate/dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to Parkinson's disease. // *Synapse.* -1995.-V.19. -P.264-293.
473. St Clair D., Blackwood D., Muir W., Carothers A., Walker M., Spowart G., Gosden C., Evans H.J. Association within a family of a balanced autosomal translocation with major mental illness. // *Lancet.* -1990. -V.336 (8706). -P.13-16.
474. Steele R.J., Morris R.G. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. // *Hippocampus.* -1999. V.9. -P.118–136.
475. Stefansson H., Sigurdsson E., Steinthorsdottir V., Bjornsdottir S., Sigmundsson T., Ghosh S., et al. Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. // *Am J Hum Genet.* -2002. -V.71. -P.877–892.
476. Snyder S.H. The dopamine hypothesis of schizophrenia: focus on the dopamine receptor. // *Am J Psychiatry.* -1976. -V.133(2). -P.197-202.
477. Su P., Li S., Chen S., Lipina T.V., Wang M., Lai T.K., Lee F.H., Zhang H., Zhai D., Ferguson S.S., Nobrega J.N., Wong A.H., Roder J.C., Fletcher P.J., Liu F. A dopamine D2 receptor-DISC1 protein complex may contribute to antipsychotic-like effects. // *Neuron.* – 2014. -V.4(6). -P.1302-16.

478. Sullivan P.F., Kendler K.S., Neale M.C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. // *Arch. Gen. Psychiatry.* -2003. -V.60. – P.1187-1192.
479. Sullivan P. F., Daly M. J., O'Donovan M. Genetic architectures of psychiatric disorders: the emerging picture and its implications. // *Nat. Rev. Genet.* -2012. -V.13. - P.537.
480. Sullivan E. M., O'Donnell P. Inhibitory interneurons, oxidative stress, and schizophrenia. // *Schizophr Bull.* – 2012. -V.38. -P.373-376.
481. Sulzer D., Chen T.K., Lau Y.Y., Kristensen H., Rayport S., Ewing A. Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. // *J Neurosci.* – 1995. -V.15. -P.4102–4108.
482. Sulzer D., Sonders M.S., Poulsen N.W., Galli A. Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. // *Prog Neurobiol.* – 2005. -V.75. -P.406–433.
483. Susser E., Brown A.S., Klonowski E., Allen R.H., Lindenbaum J. Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association. // *Biol. Psychiatry.* - 1998. -V.44. -P.141–143.
484. Susser E., St Clair D., He L. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* -2008. -V.1136. -P.85–92.
485. Suvisaari J.M., Saarni S.I., Perälä J., Suvisaari J.V.J., Härkänen T., Lönnqvist J., Reunanen A. Metabolic syndrome among persons with schizophrenia and other psychotic disorders in a general population survey. // *J. Clin. Psychiatry.* - 2007. -V.68. -P.1045–55
486. Svenningsson P., Tzavara E.T., Carruthers R., Rachleff I., Wattler S., Nehls M., McKinzie D.L., Fienberg A.A., Nomikos G.G., Greengard P. Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. // *Science.* -2003. -V.302. -P.1412–1415.
487. Sweet R.A., Pierri J.N., Auh S., Sampson A.R., Lewis D.A. Reduced pyramidal cell somal volume in auditory association cortex of subjects with schizophrenia. // *Neuropsychopharmacology.* – 2003. -V.28. -P.599–609.
488. Swerdlow N.R., Braff D.L., Taaid N., Geyer M.A. Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenia patients. // *Arch Gen Psychiatry.* -1994. -V.51. -P.139–154
489. Swerdlow N.R., Geyer M.A. Clozapine and haloperidol in an animal-model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* - 1999. - V.44. -P.741–744.

490. Tai Y.F., Pavese N., Gerhard A., Tabrizi S.J., Barker R.A., Brooks D.J., Piccini P. Imaging microglial activation in Huntington's disease. // *Brain Res. Bull.* – 2007. -V.72. -P.148–151.
491. Takahashi M., Shirakawa O., Toyooka K., Kitamura N., Hashimoto T., Maeda K. et al. Abnormal expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptor in the corticolimbic system of schizophrenic patients. // *Mol Psychiatry.* -2000. -V.5. -P.293–300.
492. Tandon R., Nasrallah H., Keshavan M.S. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. // *Schizophr. Res.* – 2009. -V.110. -P.1-23.
493. Taya S., Shinoda T., Tsuboi D., Asaki J., Nagai K., Hikita T., Kuroda S., Kuroda K., Shimizu M., Hirotsune S., Iwamatsu A., Kaibuchi K. DISC1 regulates the transport of the NUDEL/LIS1/14-3-3epsilon complex through kinesin-1. // *J. Neurosci.* -2007. -V.27. -P.15–26.
494. Taylor M.S., Devon R.S., Millar J.K., Porteous D.J. Evolutionary constraints on the Disrupted in Schizophrenia locus. // *Genomics.* -2003. -V.81 (1). -P.67-77.
495. Thomas T.C., Kruzich P.J., Joyce B.M., Gash C.R., Suchland K., Surgener S.P., Rutherford E.C., Grandy D.K., Gerhardt G.A., Glaser P.E. Dopamine D4 receptor knockout mice exhibit neurochemical changes consistent with decreased dopamine release. // *J Neurosci Methods.* -2007. -V.166. -P.306–314.
496. Thompson B. L., Levitt P. Now you see it, now you don't—closing in on allostasis and developmental basis of psychiatric disorders. // *Neuron.* - 2010. -V.65. -P.437–439
497. Thomson P.A., Malavasi E.L., Grunewald E., Soares D.C., Borkowska M., Millar J.K. DISC1 genetics, biology and psychiatric illness. // *Front. Biol.* -2013. -V.8. -P.1–31.
498. Thomson P.A., Parla J.S., McRae A.F., Kramer M., Ramakrishnan K., Yao J., Soares D.C., McCarthy S., Morris S.W., Cardone L., Cass S., Ghiban E., Hennah W., Evans K.L., Rebolini D, Millar JK, Harris SE, Starr JM, MacIntyre DJ; Generation Scotland, McIntosh AM, Watson JD, Deary IJ, Visscher PM, Blackwood DH, McCombie WR, Porteous DJ. 708 Common and 2010 rare DISC1 locus variants identified in 1542 subjects: analysis for association with psychiatric disorder and cognitive traits. // *Mol Psychiatry.* – 2014. -V.19(6). -P.668-675.
499. Tkachev D. et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. // *Lancet.* -2003. -V.362. -P.798–805.
500. Toua C., Brand L., Moller M., Emsley R.A., Harvey B.H. The effects of sub-chronic clozapine and haloperidol administration on isolation rearing induced changes in

- frontal cortical *N*-methyl-Daspartate and D1 receptor binding in rats. // *Neuroscience*. - 2010. -V. 165. -P.492–499.
501. Traynelis S.F., Wollmuth L.P., McBain C.J., Menniti F.S., Vance K.M., Ogden K.K., Hansen K.B., Yuan H., Myers S.J., Dingledine R. // *Pharmacol.Rev.* – 2010. -V.62. -P. 405–496.
502. Tremolizzo L., Doueiri M.S., Dong E., Grayson D.R., Davis J., et al. Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice. // *Biol Psychiatry*. -2005. -V.57. -P.500–509.
503. Trossbach S.V., Bader V, Hecher L., Pum M.E., Masoud S.T., Prikulis I, Schäble S., de Souza Silva M.A., Su P., Boulat B., Chwiesko C., Poschmann G., Stühler K., Lohr K.M., Stout K.A., Oskamp A., Godsave S.F., Müller-Schiffmann A., Bilzer T., Steiner H., Peters P.J., Bauer A., Sauvage M., Ramsey A.J., Miller G.W., Liu F., Seeman P., Brandon N.J., Huston J.P., Korth C. Misassembly of full-length Disrupted-in-Schizophrenia 1 protein is linked to altered dopamine homeostasis and behavioral deficits. // *Mol Psychiatry*. -2016. -V.21(11). -P.1561-1572.
504. Tsai G., Coyle J.T. Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. -2002. -V.42. -P.165–179.
505. Tsankova N., Renthal W., Kumar A., Nestler E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. // *Nat. Rev. Neurosci.* -2007. -V.8. -P.355–367.
506. Tseng K.Y., O'Donnell P. Dopamine modulation of prefrontal cortical interneurons changes during adolescence. // *Cereb. Cortex*. -2007a. -V.17. -P.1235–1240
507. Tseng K.Y. et al. Post-pubertal disruption of medial prefrontal cortical dopamine–glutamate interactions in a developmental animal model of schizophrenia. // *Biol. Psychiatry*. -2007b. V.62. -P.730–738.
508. Tseng K.Y., Chambers R.A., Lipska B.K. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. // *Behav Brain Res*. - 2009. -V.204. -P.295–305.
509. Tseng H.H., Chen S.H., Liu C.M., Howes O., Huang Y.L., Hsieh M.H., Liu C.C., Shan J.C., Lin Y.T., Hwu H.G. Facial and prosodic emotion recognition deficits associate with specific clusters of psychotic symptoms in schizophrenia. // *PLOS ONE*. - 2013. - V.8. -P.e66571.
510. Tunbridge E.M., Bannerman D.M., Sharp T., Harrison P.J. Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. // *J Neurosci.* – 2004. V.24. -P.5331–5335.

511. Uhlhaas P.J. et al. The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia. // *Schizophr. Bull.* - 2008. -V.34. -P.927–943.
512. Umeda K., Suemaru K., Todo N., Egashira N., Mishima K., et al. Effects of mood stabilizers on the disruption of prepulse inhibition induced by apomorphine or dizocilpine in mice. // *Eur J Pharmacol.* -2006. -V.553. -P.157–162.
513. Valiente M., Martini F.J. Migration of cortical interneurons relies on branched leading process dynamics. // *Cell Adhes.* -2009. -V.3. -P.278–280.
514. van der Linden I., Afman L.A., Heil S.G., Blom H.J. Genetic variation in genes of folate metabolism and neural tube defect risk. // *Proc. Nutr. Soc.* -2006. -V.65. -P.204–215.
515. van Os J., Kenis G., Rutten B.P. The environment and schizophrenia. // *Nature.* - 2010. -V. 468. -P.203-212.
516. Van Os J., Selten J.P. Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. // *Br. J. Psychiatry.* - 1998. -V. 172. -P.324–326.
517. Vasan R.S. Biomarkers of cardiovascular disease: Molecular basis and practical considerations. // *Circulation.* -2006. -V.113. -P.2335-2362.
518. Vercauteren F.G., Flores G., Ma W., Chabot J.G., Geenen L., Clerens S., et al An organelle proteomic method to study neurotransmission-related proteins, applied to a neurodevelopmental model of schizophrenia. // *Proteomics.* -2007. -V.7. -P.3569–3579.
519. Viñals X., Maldonado R., Robledo P. Effects of repeated treatment with MDMA on working memory and behavioural flexibility in mice. // *Addict Biol.* – 2013. -V.18(2). -P.263-273.
520. Visscher P.M., Goddard M.E., Derks E.M., Wray N.R. Evidence-based psychiatric genetics, AKA the false dichotomy between common and rare variant hypotheses. // *Mol. Psychiatry.* -2012. -V.17. -P.474.
521. Vogel C., Marcotte E.M. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. // *Nat. Rev. Genet.* -2012. -V.13. -P. 227–232.
522. Volman V., Behrens M.M., Sejnowski T.J. Downregulation of parvalbumin at cortical GABA synapses reduces network gamma oscillatory activity. // *J Neurosci.* – 2011. -V.31. -P.18137-18148.
523. Vomund S., Sapir T., Reiner O., Silva M.A., Korth C. Generation of topically transgenic rats by in utero electroporation and in vivo bioluminescence screening. // *J Vis Exp.* -2013. -V.79. -P.e50146.

524. Vuillermot S., Weber L., Feldon J., Meyer U. A longitudinal examination of the neurodevelopmental impact of prenatal immune activation in mice reveals primary defects in dopaminergic development relevant to schizophrenia. // *J Neurosci.* -2010. - V.30. -P.1270–1287.
525. Walsh T., McClellan J.M., McCarthy S.E., et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. // *Science.* – 2008. - V.320. -P.539.
526. Walton E., Liu J., Hass J., White T., Scholz M., Roessner V., Gollub R., Calhoun V.D., Ehrlich S. MB-COMT promoter DNA methylation is associated with working-memory processing in schizophrenia patients and healthy controls. // *Epigenetics.* - 2014. -V.9. -P.1101–1107.
527. Wan R.Q., Hartman H., Corbett R. Alteration of dopamine metabolites in CSF and behavioral impairments induced by neonatal hippocampal lesions. // *Physiol Behav.* - 1998. -V.65. -P.429–436.
528. Wan R.Q., Corbett R. Enhancement of postsynaptic sensitivity to dopaminergic agonists induced by neonatal hippocampal lesions. // *Neuropsychopharmacology.* - 1997. -V.16. -P.259–268.
529. Wang Q., Charych E.I., Pulito V.L., Lee J.B., Graziane N.M., Crozier R.A., Revilla-Sanchez R., Kelly M.P., Dunlop A.J., Murdoch H., Taylor N., Xie Y., Pausch M., Hayashi-Takagi A., Ishizuka K., Seshadri S., Bates B., Kariya K., Sawa A., Weinberg R.J., Moss S.J., Houslay M.D., Yan Z., Brandon N.J. The psychiatric disease risk factors DISC1 and TNIK interact to regulate synapse composition and function. // *Mol. Psychiatry.* - 2011. -V.16. -P.1006–1023.
530. Wang H., Brown J., Martin M. Glycogen synthase kinase 3: a point of convergence for the host inflammatory response. // *Cytokine.* -2011. -V.53. -P.130–140.
531. Wassef A., Baker J., Kochan L.D. GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. // *J Clin psychopharmacol.* – 2003. V.23. -P.601–640.
532. Watson P.J., Fairall L., Schwabe J.W. Nuclear hormone receptor co-repressors: structure and function. // *Mol. Cell. Endocrinol.* -2012. -V.348. -P.440–449.
533. Wei L., Du Y., Wu W., Fu X., Xia Q. Elevation of plasma neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) levels in schizophrenia patients. // *J Affect Disord.* – 2018. - V.15. -P.307-312.

534. Weiss I.C., Feldon J., Domeney A.M. Isolation rearing-induced disruption of prepulse inhibition: further evidence for fragility of the response. // *Behav Pharmacol.* - 1999. -V.10. -P.139–149.
535. Weiss I.C., Pryce C.R., Jongen-Relo A.L., Nanz-Bahr N.I., Feldon J. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. // *Behav Brain Res.* - 2004. -V.152. -P.279–295.
536. Weickert C.S., Weickert T.W., Pillai A., Buckley P.F. Biomarkers in schizophrenia: a brief conceptual consideration. // *Dis. Markers.* -2013. -V.35. -P.3–9.
537. Weiner I., Lubow R.E., Feldon J. Abolition of the expression but not the acquisition of latent inhibition by chronic amphetamine in rats. // *Psychopharmacology (Berl).* – 1984. -V.83. -P.194–199.
538. Weiner I., Lubow R.E., Feldon J. Disruption of latent inhibition by acute administration of low doses of amphetamine. // *Pharmacol Biochem Behav.* – 1988. -V.30. -P.871–878.
539. Weiner I., Shadach E., Tarrasch R., Kidron R., Feldon J. The latent inhibition model of schizophrenia: further validation using the atypical neuroleptic, clozapine. // *Biol Psychiatry.* – 1996. -V.40. -P.834–843.
540. Weinstock M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. // *Prog. Neurobiol.* - 2001. -V.65. -P.427–451.
541. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* - 2008. -V.32. -P.1073–1086.
542. Whittington M.A., Cunningham M.O., LeBeau F.E., Racca C., Traub R.D. Multiple origins of the cortical γ rhythm. // *Developmental neurobiology.* -2011. -V.71. -P.92-106.
543. Wilkins M.R., Sanchez J.-C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D.F., Williams K.L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. // *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* - 1996. -V.13. -P.19–50.
544. Williams S.M., Goldman-Rakic P.S., Leranth C. The synaptology of parvalbumin-immunoreactive neurons in the primate prefrontal cortex. // *The Journal of comparative neurology.* -1992. -V.320. -P.353-369.
545. Williams R.S., Cheng L., Mudge A.W., Harwood A.J. A common mechanism of action for three mood-stabilizing drugs. // *Nature.* -2002. -V.417. -P.292–295.
546. Willner P. The validity of animal models of depression. // *Psychopharmacology(Berl).* - 1984. -V.83. -P.1–16.

547. Willott J.F., Tanner L., O'Steen J., Johnson K.R., Bogue M.A., Gagnon L. Acoustic startle and prepulse inhibition in 40 inbred strains of mice. // *Behav Neurosci.* - 2003. -V.117(4). -P.716-727.
548. Winterer G., Weinberger D.R. Genes, dopamine and cortical signal-to-noise ratio in schizophrenia. // *Trends Neurosci.* – 2004. -V.27(11). -P.683-690.
549. Wolosker H. Serine racemase and the serine shuttle between neurons and astrocytes. // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. -V.1814. -P.1558–1566.
550. Wray N.R., Visscher P.M. Narrowing the boundaries of the genetic architecture of schizophrenia. // *Schizophr. Bull.* – 2010. -V.36. -P.14.
551. Wright I.C., Rabe-Hesketh S., Woodruff P.W.R., David A.S., Murray R.M., Bullmore E.T. Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. // *Am. J. Psychiatry.* - 2000. -V.157. -P.16–25.
552. Wynshaw-Boris A. Lissencephaly and LIS1: insights into the molecular mechanisms of neuronal migration and development. // *Clin. Genet.* - 2007. -V.72. -P.296–304.
553. Yang C. R., Seamans J. K., Gorelova N. Developing a neuronal model for the pathophysiology of schizophrenia based on the nature of electrophysiological actions of dopamine in the prefrontal cortex. // *Neuropsychopharmacology.* – 1999. V.21. -P.161-194.
554. Yamashita N., Miyashiro M., Baba J., Sawa A. Rolipram, a selective inhibitor of phosphodiesterase type 4, pronouncedly enhanced the forskolin-induced promotion of dopamine biosynthesis in primary cultured rat mesencephalic neurons. // *Jpn J Pharmacol.* – 1997. V.75. -P.91–95.
555. Yingling J., Youn Y.H., Darling D., Toyo-Oka K., Pramparo T., Hirotsune S., Wynshaw-Boris A. Neuroepithelial stem cell proliferation requires LIS1 for precise spindle orientation and symmetric division. // *Cell.* - 2008. -V.132. -P.474–486.
556. Young C.E., Arima K., Xie J., Hu L., Beach T.G., Falkai P., Honer W.G. SNAP-25 deficit and hippocampal connectivity in schizophrenia. // *Cereb Cortex.* -1998. -V.8. -P.261–268.
557. Young-Pearse T.L., Suth S., Luth E.S., Sawa A., Selkoe D.J. Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. // *J. Neurosci.* - 2010. -V.30. -P.10431–10440.
558. Zalesky A., Pantelis C., Cropley V., Fornito A., Cocchi L., McAdams H., Clasen L., Greenstein D., Rapoport J.L., Gogtay N. Delayed Development of Brain Connectivity

- in Adolescents With Schizophrenia and Their Unaffected Siblings. // *JAMA Psychiatry*. - 2015. -V.72(9). -P.900-908.
559. Zhang H.T., Huang Y., Jin S.L.C., Frith S.A., Suvarna N., Conti M., O'Donnell J.M. Antidepressant-like profile and reduced sensitivity to rolipram in mice deficient in the PDE4D phosphodiesterase enzyme. // *Neuropsychopharmacology*. -2002. -V.27. - P.587–595.
560. Zhang H.T. Cyclic AMP-specific phosphodiesterase-4 as a target for the development of antidepressant drugs. // *Curr. Pharm. Des.* -2009. -V.15. -P.1688–1698.
561. Zeng H., Chattarji S., Barbarosie M., Rondi-Reig L., Philpot B.D., Miyakawa T., et al. Forebrain-specific calcineurin knockout selectively impairs bidirectional synaptic plasticity and working/episodic-like memory. // *Cell*. -2001. -V.107. -P.617–629.
562. Zhao C., Deng W., Gage F.H. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. // *Cell*. -2008. -V.132. -P.645–660.
563. Zheng Q.Y., Johnson K.R., Erway L.C. Assessment of hearing in 80 inbred strains of mice by ABR threshold analyses. // *Hear Res.* – 1999. -V.130(1-2). -P.94-107.
564. Zipparo L., Whitford T.J., Redoblado Hodge M.A., Lucas S., Farrow T.F.D., Brennan J., Gomes L., Williams L.M., Harris A.W.F. Investigating the neuropsychological and neuroanatomical changes that occur over the first 2-3 years of illness in patients with first-episode schizophrenia. // *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry*. - 2008. -V.32. -P.531–538.
565. Zuckerman L., Rimmerman N., Weiner I. Latent inhibition in 35-day-old rats is not an "adult" latent inhibition: implications for neurodevelopmental models of schizophrenia. // *Psychopharmacology (Berl)*. – 2003. -V.169(3-4). -P.298-307.
566. Zuckerman L, Weiner I. Post-pubertal emergence of disrupted latent inhibition following prenatal immune activation. // *Psychopharmacology (Berl)*. -2003. -V.169. - P.308–313.
567. Zugno A.I., Canever L., Mastella G., Heylmann A.S., Oliveira M.B., Steckert A.V., Castro A.A., dal Pizzol F., Quevedo J., Gama C.S. Effects of omega-3 supplementation on interleukin and neurotrophin levels in an animal model of schizophrenia. // *An Acad Bras Cienc*. - 2015. -V.87. -P.1475-86.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- АПС – антипсихотическое соединение
- ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
- ГД – гестационный день развития
- ДА – дофамин
- дБ - децибел
- ДЗ – dizigotnyy
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИЛ-1 β – интерлейкин-1 β
- ИЛ-6 – интерлейкин-6
- ИЛ-8 - интерлейкин-8
- ИЛ-10 - интерлейкин-10
- МАЛДИ - матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- МАМ - ацетат метилазоксиметанола
- МЗ - монозиготный
- МИА – материнская иммунная активация
- МК-801 – dizosilpine
- ПНД – постнатальный день
- ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭПС - экстрапирамидный синдром
- Akt1 - АКТ Serine/Threonine Kinase 1
- АРОА-I - Apolipoprotein A1
- ARC - activity-regulated cytoskeleton-associated protein
- AP2 - AP2 Associated Kinase 1
- AMPA - α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors
- ARHGAP24 - Rho GTPase Activating Protein 24
- BDNF – brain derived neurotrophic factor
- CACNA1C - Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C
- CACNB2 - Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Beta 2
- CACNA1I - Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 I
- CNTRICS - Cognitive Neuroscience measures of Treatment Response of Impaired Cognition in Schizophrenia
- CNV – вариация числа копий гена

COMT - catechol-o-methyltransferase
DISC1 – Disrupted-In-Schizophrenia-1
DN-DISC1 – доминантно-негативная форма DISC1
hmDISC1 – human DISC1 (человеческая форма DISC1)
D1 - дофаминовый рецептор 1го типа
D2 – дофаминовый рецептор 2го типа
D2^{high} – высокочувствительный дофаминовый рецептор 2го типа
DARPP-32 - Dopamine And CAMP Regulated Phosphoprotein
DDX19A - DEAD-Box Helicase 19A
DRD3 – дофаминовый рецептор 3го типа
EAAT - excitatory amino acid transporter
Egr2 - Early Growth Response 2
ErbB4 - Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 4
FMRP - fragile X mental retardation protein
Fosb - FosB Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
FOXN3 - Forkhead Box N3
GAD67 – глутамат декарбоксилаза-1 (мол. вес 67 кДа)
GFAP - Glial Fibrillary Acidic Protein
Gprk6 - G protein-coupled receptor kinase 6
GRIA1 - субъединица 1го типа глутаматного ионотропного рецептора AMPA
GRIN2A – субъединица 2го типа глутаматного ионотропного рецептора NMDA
GRM3 – глутаматные метаботропные рецепторы 3го типа
GSK-3 – гликоген синтаз киназа 3го типа
GWAS – Genome-Wide Association Studies
Hist1h1c - Histone Cluster 1 H1 Family Member C
Hist1h2AC - Histone Cluster 1 H2A Family Member C
Hist1h2be - Histone Cluster 1 H2B Family Member E
IL-6 – интерлейкин-6
IFN- γ – интерферон-гамма
LBD - ligand-binding domain
Lcn2 – липокалин-2
LPS – липополисахарида
MARK - microtubule affinity regulating kinase 1
mGluR - метаботропные глутаматные рецепторы
NMDA – N-methyl-D-aspartate

NRG1 – нейрегулин1
Nurr1 - Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2
PCP - фенциклидин
PDE4B – фосфодиэстераза 4го типа
PolyI:C – polyinosinic:polycytidylic acid
PP2A - Protein Phosphatase 2 Phosphatase Activator
PSD-95 – post-synaptic density protein 95
PTEN – Phosphatase And Tensin Homolog
PV – parvalbumin
RELN - реелин
RIKEN – сокращенное имя Rikagaku Kenkyūsho
ROCK2 - Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2
S100 – S100 calcium binding protein P
SAP-102 - Discs Large MAGUK Scaffold Protein 3
SAT1 - Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1
SNP - однонуклеотидный полиморфизм
SRR- серин рацемаза
STAT1 - Signal Transducer And Activator Of Transcription 1
TAT-peptide – TransActivator of Transcription вируса иммунодефицита человека (GRKKRRQRRRPQ), проникающий в клетку пептид
TDZD-8 - thiadiazolidine derivative (chemical name: 2-Methyl-4-(phenylmethyl)-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione)
TNF- α – tumor necrosis factor- α
Tsc2 - Tuberous Sclerosis 2 Protein
TSFM - Ts Translation Elongation Factor, Mitochondrial
VTA - вентральная тегментальная область

Таблица 1 Акустическая реакция вздрагивания у мышей 100P/100P и WT на фоне введения вальпроата /физ. раствора

Генотип/Препарат	Физ. раствор	Вальпроат
20 часов после последней инъекции вальпроата		
Акустическая реакция вздрагивания		
WT (n=16/18)	920.1 ± 89.1	943.6 ± 142.8
100P/100P (n=29/36)	512.1 ± 150.2 *	676.3 3 ± 107.1#
3 недели после последней инъекции вальпроата		
Акустическая реакция вздрагивания		
WT (n=11/12)	833.6 ± 57.7	827.6 ± 66.8
100P/100P (n=10/11)	447.8 ± 58.6 *	716.5 ± 82.9 #

* $p < 0.001$ – по сравнению с WT мышами, получавшими физ. раствор; # $p < 0.05$ – по сравнению с 100P/100P мышами, получавшими физ. раствор. ANOVA выявила эффект генотипа [$F(1,95) = 32.4, p < 0.001$], но не эффект вальпроата [$F(1,95) = 4.7, p > 0.05$] на акустическую реакцию вздрагивания спустя 20 часов после последней инъекции вальпроата; ANOVA обнаружил эффект препарата [$F(1,40) = 3.87, p \leq 0.05$] и тренд в сторону достоверности эффекта генотип x препарат взаимодействий [$F(1,40) = 4.4, p = 0.07$] на акустическую реакцию вздрагивания спустя 3 недели после последней инъекции вальпроата.

Таблица 2. Список генов с повышенной экспрессией, вызванной *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ мутацией в гиппокампе

Символ гена	Название гена NCBI ID	Функция	P-уровень
Pglyrp1	Peptidoglycan recognition protein 1 21946	Immune system; Apoptosis	9.94E-03
Gga1	Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1 106039	Vesicle-mediated transport, Intracellular protein transport	5.26E-02
Upf1	UPF1 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast) 19704	mRNA catabolic process	7.46E-02
Pacsin1	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1 23969	Cytoskeleton, Endocytosis	5.03E-02
Purb	Purine rich element binding protein B 19291	Transcriptional factor, Apoptosis, Proliferation	3.03E-02
Stard13	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13 243362	Cytoskeleton, Cell cycle, Proliferation, Signal transduction	5.25E-02
A930018M24Rik	RIKEN cDNA A930018M24 gene 328399	Unknown	5.26E-02
Ppfia3	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 3 76787	Unknown	6.02E-02
Lcn2	Lipocalin 2 16819	Immune system, Proliferation, Apoptosis	7.24E-02
Rnase4	Ribonuclease, RNase A family 4 16819	Catalyzes the degradation of RNA	7.72E-02

Celf4	CUGBP, Elav-like family member 4 108013	mRNA binding and splicing	8.99E-02
Slc35c2	Solute carrier family 35, member C2 228875	Transport	8.99E-02
Caskin1	CASK interacting protein 1 268932	Signal transduction	9.07E-02
Lrrc8a	Leucine rich repeat containing 8A 241296	Unknown	9.11E-02
Xrcc1* ¹	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 22594	DNA repair	9.11E-02
Agxt211* ²	<i>Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1</i> 71760	Unknown	9.75E-02
Adar	Adenosine deaminase, RNA-specific 56417	Transcriptional factor, Apoptosis, Proliferation, cell migration	9.75E-02
Eif4ebp2	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2 13688	Translation; Synaptic plasticity and memory	9.9E-02

Гены, экспрессия которых была скорректирована вальпроатом, выделены серым цветом. *
- гены ассоциированные с шизофренией; p – уровень статистической значимости по
сравнению с диким типом

Таблица 3 Список генов с пониженной экспрессией, вызванной *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ мутацией в гиппокампе

Символ гена	Название гена NCBI ID	Функция	P-уровень
Arc	<i>Activity regulated cytoskeletal-associated protein</i> 11838	Cytoskeleton, Synapse development, Synaptic plasticity and memory	5.26E-02
Egr2	<i>Early growth response 2</i> 13654	Transcriptional Factor, Myelination, Motor axon guidance, Brain segmentation; Apoptosis, Immune system, Cognition	2.46E-02
Xpo7	<i>Exportin 7</i> 65246	Transport; Proliferation, Cell division via export of 14-3-3σ	1.64E-02
Dusp1	<i>Dual specificity phosphatase 1</i> 19252	Apoptosis, Proliferation	2.46E-02
Fam63a	<i>Family with sequence similarity 63, member A</i> 75007	Cell differentiation	4.27E-02
Cdc42ep2	<i>CDC42 effector protein (RhoGTPase binding) 2</i> 104252	Cytoskeleton, cell shape	7.46E-02
Slc40a1	<i>Solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1</i> 53945	Iron ion transmembrane transporter	7.24E-02
Arhgap24	<i>RhoGTPase activating protein 24</i> 231532	Proliferation, Cell morphology, motility, aggregation, differentiation; Angiogenesis	7.46E-02
BC066028	<i>cDNA sequence BC066028</i> 407812	Metal ion binding	4.96E-02
Egr4	<i>Early growth response 4</i> 13656	Transcriptional Factor, Synaptic plasticity	5.26E-02
Ddah1	<i>Dimethylargininedimethylaminohydrolase 1</i> 69219	Arginine metabolism, Nitric oxide biosynthesis; Angiogenesis	5.26E-02
Rnf214	<i>Ring finger protein 214</i> 235315	Metal ion binding; protein binding	5.26E-02
Slc35c1	<i>Solute carrier family 35, member C1</i>	Lipid glycosylation	5.26E-02

	228368		
Ssb4	<i>splA/ryanodine receptor domain and SOCS box containing 4</i> 211949	Intracellular signaling pathway	6.00E-02
BC005624	<i>cDNA sequence BC005624</i> 227707	Unknown	6.00E-02
1700123O20 Rik	<i>RIKEN cDNA 1700123O20 gene</i> 58248	Unknown	6.00E-02
Ppp2ca* ³	<i>Protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform</i> 19052	Proliferation, Cell cycle	6.00E-02
Junb	<i>Jun-B oncogene</i> 16477	Transcriptional Factor, Proliferation, Cell cycle, Vasculogenesis	6.74E-02
Lrsam1	<i>Leucine rich repeat and sterile alpha motif containing 1</i> 227738	Metal ion binding, Protein transport	6.74E-02
Dcun1d4	<i>DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4</i> 100737	Unknown	7.24E-02
Fntb	<i>Farnesyltransferase, CAAX box, beta</i> 110606	Proliferation, Cell cycle, Immune system	7.24E-02
Rpf1	<i>Ribosome production factor 1 homolog (S. cerevisiae)</i> 70285	Ribosome biogenesis, rRNA processing	7.46E-02
Aplp2	<i>Amyloid beta (A4) precursor-like protein₂</i> 11804	Embryonic development, Synaptic transmission, Apoptosis	7.46E-02
Igf1	<i>Insulin-like growth factor 1</i> 16000	Proliferation, Apoptosis, Cell development cell differentiation, migration	7.46E-02
Irf2bp1	<i>Interferon regulatory factor 2 binding protein 1</i> 272359	Transcriptional Factor; Proliferation	7.46E-02
Elm1	<i>Engulfment and cell motility 1, ced-12 homolog (C. elegans)</i> 140580	Cytoskeleton, Cell motility, Apoptosis	7.46E-02

Kbtbd4	<i>Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4</i> 67136	Unknown	7.46E-02
Fam185a	<i>Family with sequence similarity 185, member A</i> 330050	Unknown	7.46E-02
Smap2	<i>Stromal membrane-associated GTPase-activating protein 2</i> 69780	Metal ion binding, GTPase activity	7.46E-02
Samd4	<i>Sterile alpha motif domain containing 4</i> 74480	Post-translational regulator in neurons at post-synaptic level	7.46E-02
Mtap7d1	<i>Microtubule-associated protein 7 domain containing 1</i> 245877	Cytoskeleton	7.72E-02
Rpap3	<i>RNA polymerase II associated protein 3</i> 71919	Unknown	8.88E-02
Dnajc6	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6</i> 72685	Endocytosis	8.99E-02
Csrnp2	<i>Cysteine-serine-rich nuclear protein 2</i> 207785	Transcriptional Factor, Apoptosis	8.99E-02
Nup210	<i>Nucleoporin 210</i> 54563	mRNA transport, protein transport	9.11E-02
Rasl12	<i>RAS-like, family 12</i> 70784	Signal transduction, GTPase activity	9.11E-02
Rnft2	<i>Ring finger protein, transmembrane 2</i> 269695	Unknown	9.26E-02
Tomm20	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast)</i> 67952	Unfolded protein binding, Protein transport	9.26E-02
1200014J11Rik	<i>RIKEN cDNA 1200014J11 gene</i> 66874	Unknown	9.62E-02
Fhl1	<i>Four and a half LIM domains 1</i>	Multicellular organismal development, Cell differentiation, Apoptosis	9.62E-02

	14199		
Ceacam1	<i>Cerebral endothelial cell adhesion molecule</i> 99151	Cell adhesion	9.75E-02
Ang1	<i>Angiopoietin 1</i> 11600	Angiogenesis, Apoptosis, Cell adhesion, differentiation, Multicellular organismal development	9.75E-02
Phc1	<i>Polyhomeotic-like 1 (Drosophila)</i> 13619	Chromatin binding activity, Multicellular organismal development	9.75E-02

Гены, экспрессия которых была скорректирована вальпроатом, выделены серым цветом. *
- гены ассоциированные с шизофренией; p – уровень статистической значимости по сравнению с диким типом

Таблица 4 Список генов с измененной экспрессией, вызванной *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ мутацией в СТВОЛЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Символ гена	Название гена NCBI ID	Функции	P-уровень
Mrpl39	mitochondrial ribosomal protein L39 27393	Mitochondrial genome maintenance, Translation	7.08E-02
Jph2	junctionophilin 2 59091	Elevation of cytosolic Ca ²⁺ , multicellular organismal development	7.08E-02
Wnt6	wingless-related MMTV integration site 6 22420	Multicellular organismal development, Cell- cell signaling, Signal transduction, organ morphogenesis	7.08E-02
Klrg1	killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1 50928	Immune system, cell surface receptor linked signaling pathway	7.08E-02
Kcnq2	potassium voltage-gated channel, subfamily Q, member 2 16536	Potassium ion transport, Seizures, hyperactivity	7.08E-02
Slc6a12	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12 14411	Betaine / Carnitine / Choline transporter, Cellular water homeostasis, Neurotransmitter transport	7.26E-02
Chrna9	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 9 231252	Cation transport, Sensory detection of sound and inner ear morphogenesis	7.26E-02
Sphk1	sphingosine kinase 1 20698	Cell differentiation, motility, Apoptosis	8.91E-02
Ranbp31	RAN binding protein 3-like 223332	Intracellular transport	8.91E-02
Mrgprf	MAS-related GPR, member F 211577	Signal transduction [G-protein coupled receptor activity)	8.91E-02
Upk1a	uroplakin 1A 109637	Endocytosis, Signal transduction	8.91E-02
Lcn2*	Lipocalin 2	Immune system, Proliferation, Apoptosis	7.08E-02

	16819		
Ly6c*	lymphocyte antigen 6 complex, locusC1 17067	Immune system	8.91E-02

Без меток – гены с пониженной экспрессией, * гены с повышенной экспрессией;
 Экспрессия генов, скорректированная вальпроатом, выделена серым цветом; p – уровень
 статистической значимости по сравнению с диким типом

Таблица 5. Список генов с измененной экспрессией, вызванной вальпроатом вне зависимости от *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ мутации в отделах головного мозга

Символ гена	Название гена NCBI ID	Функции	Р- уровень
Гиппокамп			
Hist1h1c	Histone cluster 1, H1c 50708	Nucleosome Assembly, Epigenetic	4.36E-04
Hist1h2be	Histone cluster 1, H2be 319179	Nucleosome Assembly, Epigenetic	1.13E-03
Clcn2	Chloride channel 2 12724	Neuronal conductance/excitability	8.3E-02
Стриатум			
Egr2	Early growth response 2 13654	Transcriptional Factor, Myelination, Motor axon guidance, Brain segmentation; Apoptosis, Immune system, Cognition	5.54E-02
Fosb	FBJ osteosarcoma oncogene B 14282	Transcriptional factor, Cell proliferation, differentiation	5.54E-02

p – уровень статистической значимости по сравнению с физиологическим раствором

Таблица 6 Список генов с измененной экспрессией, вызванной взаимодействиями *DISC1* Rgsc¹³⁹⁰ х вальпроат в отделах головного мозга

Символ гена	Название гена NCBI ID	Функции	P-уровень
Гены с повышенной экспрессией			
Irx3	<i>Iroquois related homeobox 3 (Drosophila)</i> 16373	Transcriptional factor, Neurodevelopment, Neuronal differentiation	2.99E-02
Zfp3611	<i>zinc finger protein 36, C3H type-like 1</i> 12192	Early-response transcription factor, regulates the response to growth factors	4.17E-02
Mcam	<i>melanoma cell adhesion molecule</i> 84004	Endothelial junction associated with the actin cytoskeleton	5.81E-02
Usp29	<i>Ubiquitin specific peptidase 29</i> 57775	Ubiquitin-dependent protein catabolic process, Epigenetic	7.09E-02
Nxf*	<i>NPAS4 neuronal PAS domain protein 4</i> 266743	Transcriptional factor	8.05E-02
Cyp27a1*	<i>CYP27A1 cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1</i> 1593	Catalyze many reactions involved in drug metabolism, synthesis of cholesterol, steroids and other lipids	8.14E-02
P2ry13	<i>Purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 13</i> 74191	Apoptosis	8.54E-02
Gab1	<i>Growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1</i> 14388	Proliferation, Cytoskeleton, Apoptosis	9.01E-02
Гены с пониженной экспрессией			
Ntrk2*	<i>Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2</i> 18212	Neurodevelopment, dendritic branching, synaptic connections, regulator of glial cells, Apoptosis, Epigenetic	2.99E-02
Gna11*	<i>Guanine nucleotide binding protein, alpha 11</i> 14672	Genetic interaction with dopamine D ₂ receptors, D _{1A} receptors	3.75E-02

Rock2	<i>Rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2</i> 19878	Apoptosis, Proliferation, Axonal growth, Cytoskeleton	8.71E-02
Bai2	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 2</i> 230775	Transcriptional Factor, Immune system, Angiogenesis	9.13E-02
Bicd2	<i>Bicaudal D homolog 2 (Drosophila)</i> 76895	Cytoskeleton	9.25E-02
Dsip1*	<i>Delta sleep-inducing peptide Tsc22d3 TSC22 domain family, member 3</i> 14605	Endocrine regulator, affect physiological functions (temperature, blood pressure, sleep pattern, stress-limiting factor), anti-carcinogenic, anti-convulsant	9.57E-02

* - гены, ассоциированные с шизофренией; p – уровень статистической значимости по сравнению с диким типом и физиологическим раствором

Таблица 7. Число GFAP⁺ и NeuN⁺ клеток на мм² в отделах головного мозга у 12-недельных 100P/100P и WT мышей.

Область мозга	WT (n = 16)	100P/100P (n = 16)
GFAP⁺ клетки		
Обонятельные луковицы	1183.2± 211.5	1393.5 ±161.3 *
Ростро-миграционный тракт	1168.2± 209.6	1358.7±186.4 *
Субгранулярная зона гиппокампа	625.6± 199.4	732.9 ±208.7
NeuN⁺ клетки		
Обонятельные луковицы	807.8 ± 58.4	870.8 ± 72.7
Ростро-миграционный тракт	200.5 ± 35.5	250.5 ± 33.9
Субгранулярная зона гиппокампа	1698.4± 204.9	1531.9± 264.8

*- $p < 0.05$ – по сравнению с WT мышами. ANOVA выявила достоверный эффект генотипа на число GFAP⁺ клеток в обонятельных луковицах [F (1,30) = 7.71; $p < 0.01$], ростро-миграционном тракте [F (1,30) = 8.18, $p < 0.01$], но не в субгранулярной зоне гиппокампа [F (1,30) = 0.39, $p > 0.05$].

Таблица 8. Число TUNEL⁺ клеток на мм² в отделах головного мозга у 12-недельных 100P/100P и WT мышей.

Область мозга	WT (n = 16)	100P/100P (n = 16)
Обонятельные луковицы	2.4 ± 1.0	1.4 ± 0.4
Ростро миграционный тракт	2.6 ± 0.5	1.3 ± 0.3
Субвентрикулярная зона	2.3 ± 0.5	1.9 ± 0.3
Субгранулярная зона гиппокампа	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3

Таблица 9. Число $ki67^+$ клеток на mm^2 в отделах головного мозга у 8-недельных 100P/100P и WT мышей.

Область мозга	WT (n = 18)	100P/100P (n = 17)
Обонятельные луковицы	22.9 ± 8.5	18.7 ± 4.9
Ростро миграционный тракт	24.6 ± 7.5	18.4 ± 6.9
Субвентрикулярная зона	12.3 ± 1.7	20.8 ± 8.2
Субгранулярная зона гиппокампа	23.4 ± 8.7	16.2 ± 3.0