# Гены, связанные с метаболизмом гомоцистеина, и функция внимания у больных шизофренией и шизоаффективным психозом

Д.б.н., проф. В.Е. ГОЛИМБЕТ, д.б.н., в.н.с. И.С. ЛЕБЕДЕВА, д.пс.н., в.н.с. М.В. АЛФИМОВА, к.м.н., с.н.с. А.Н. БАРХАТОВА, к.б.н., н.с. Т.В. ЛЕЖЕЙКО, к.м.н., с.н.с. Н.Ю. КОЛЕСИНА, м.н.с. С.А. БОРОЗДИНА, д.м.н., в.н.с. Л.И. АБРАМОВА

## Homocysteine-related genes and attention in patients with schizophrenia and schizoaffective psychosis

V.E. GOLIMBET, I.S. LEBEDEVA, M.V. ALFIMOVA, A.N. BARKHATOVA, T.V. LEZHEIKO, N.YU. KOLESINA, S.A. BOROZDINA, L.I. ABRAMOVA

Научный центр психического здоровья РАМН, Москва

**Известно, что у больных шизофренией часто наблюдается повышенное содержание гомоцистеина. Молекулярно-генетические исследования показали, что существует ассоциация между шизофренией и полиморфизмом двух генов — метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) и цистатионин-β-синтазы (ЦБС), принимающих участие в превращении гомоцистеина, соответственно, в метионин и цистеин. Авторы исследовали связь между полиморфизмами С677Т МТГФР и 844ins68 ЦБС и функцией внимания, которую оценивали с помощью метода регистрации слуховых вызванных потенциалов и теста на концентрацию внимания, у 105 больных шизофренией (56 женщин, 49 мужчин). Обнаружено, что у женщин с генотипом 844ins68 ЦБС, содержащим инсерцию (Ins+), величина латентного периода волны N100 в лобных отведениях была меньше, чем у носительниц генотипа Ins–. По данным нейропсихологического исследования женщины с генотипом Ins+ выполняли тест более успешно, чем больные с генотипом Ins–. Таким образом, полиморфизм 844ins68 ЦБС связан с функцией внимания у больных шизофренией.**

***Ключевые слова:*** *гомоцистеин, метилентетрагидрофолатредуктаза, цистатионин-β-синтаза, полиморфизм С677Т, полиморфизм 844ins68, шизофрения, слуховые вызванные потенциалы, концентрация внимания.*

**The elevated level of homocysteine has been repeatedly observed in patients with schizophrenia. Molecular-genetic studies revealed the association between schizophrenia and polymorphisms of two genes — methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and cystathionine-β-synthase (CBS) involved in the conversion of homocysteine to methionine and cysteine, respectively. Authors have studied the association of C677T MTHFR and 844ins68 CBS polymorphisms with attention in 105 schizophrenic patients (56 women and 49 men) by measuring auditory evoked potentials and concentration of attention. Women with a genotype containing an insertion (Ins+) had the shorter latency of N100 in the frontal leads compared to those with the Ins– genotype. The results of the neuropsychological study revealed that women with Ins+ genotypes performed better on the test as well. In conclusion, the 844ins68 CBS polymorphism is associated with attention in patients with schizophrenia.**

***Key words:*** *homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase, cystathionine-beta-synthase, C677T MTHFR, 844ins68 CBS, schizophrenia, auditory evoked potentials, concentration of attention.*

В исследованиях последних лет было установлено, что в патогенезе шизофрении определенную роль могут играть изменения в обмене гомоцистеина [5]. Это предположение основано на результатах, полученных при исследовании уровня гомоцистеина у больных шизофренией. Повышенное содержание этой аминокислоты было отмечено у значительной части больных, причем оно не было связано ни с побочными эффектами фармакотерапии, ни с недостатком в организме больных фолата или кобаламина [12, 15, 16]. Известно, что избыток гомоцистеина оказывает токсические эффекты на клеточном уровне, индуцируя процессы окислительного стресса, апоптоза, метилирования и разрыва ДНК [11, 19]. Уровень гомоцистеина регулируется скоростью его превращения в метионин или цистеин с помощью двух соответствующих ферментов — метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) и цистатионин-β-синтазы (ЦБС). Активность указанных ферментов зависит от различных факторов, в том числе изменений в нуклеотидной последовательности кодирующих их генов. В гене МТГФР описан полиморфизм С677Т. Замена нуклеотида цитозина на тимин в положении 677 приводит к замене аминокислоты валина на аланин в соответствующем кодоне белка, что делает фермент МТГФР термолабильным и снижает его активность примерно на 35%. У гетерозигот по данной мутации, т.е. у носителей аллеля С и аллеля Т, в крови определяется умеренно повышенный уровень гомоцистеина, причем гипергомоцистеинемия значительно нарастает при гомозиготном (два аллеля Т)

© Коллектив авторов, 2010

e-mail: golimbet@mail.ru

*Zh Nevrol Psikhiatr Im SS Korsakova 2010;110:6:86*

носительстве. В нескольких исследованиях, в том числе в результате мета-анализов соответствующих публикаций, было установлено, что генотип, содержащий 2 аллеля Т, т.е. обладающий более низкой активностью МТГФР, чаще встречается у больных шизофренией по сравнению с психически здоровыми [7, 9, 13]. ЦБС необратимо удаляет гомоцистеин из метионинового цикла путем транссульфурации его с образованием цистатионина. Этот путь метаболизма гомоцистеина становится более значимым при дефиците фолата в организме. В гене ЦБС описан полиморфизм 844ins68, обусловленный инсерцией (вставкой) участка длиной 68 пар оснований между интронами 7 и 8. В группах психически здоровых людей с вариантом гена, содержащим инсерцию (Ins+), обнаружен более низкий уровень гомоцистеина в плазме, чем у людей с вариантом без инсерции (Ins–). На основании этого факта было выдвинуто предположение, что вариант гена Ins+ кодирует фермент, отличающийся более высокой активностью [6, 17, 18]. Связь полиморфизма 844ins68 гена ЦБС с шизофренией была впервые изучена в нашем недавнем исследовании [8], которое включало более тысячи больных с различными формами шизофрении. Мы обнаружили, что частота варианта Ins+ была ниже в группе больных по сравнению с группой контроля, при этом наиболее редко он встречался у женщин с хронической (непрерывной) формой шизофрении.

Целью исследования явилось изучение связи между полиморфизмами генов МТГФР и ЦБС с функцией внимания у больных шизофренией.

При шизофрении отмечается нарушение избирательного внимания, что регистрируется с помощью как нейрофизиологических методов, так и нейропсихологических тестов. Исследования последних лет показали, что варианты некоторых генов, наиболее часто встречающихся у больных, связаны также с пониженной способностью выполнения больными когнитивных задач [1]. Мы впервые попытались выявить ассоциацию между генами, вовлеченными в метаболизм гомоцистеина, и показателями внимания, измеренными с помощью метода вызванных потенциалов и нейропсихологического теста на оценку концентрации внимания и исполнительных функций. Исходя из ранее полученных данных литературы и собственных исследований, мы предположили, что носители генотипов ТТ МТГФР и Ins– ЦБС будут иметь худшие показатели внимания, чем носители других вариантов исследуемых генов. Также в соответствии с ранее полученными данными предполагалось проверить, влияет ли пол больных на ассоциацию между генотипом ЦБС и показателями внимания.

## Материал и методы

В исследование были включены 105 больных, 56 женщин и 49 мужчин, находившиеся на лечении в клинических отделениях Научного центра психического здоровья РАМН. Их средний возраст был 29,7 (11,3)[1] года, средний возраст больных к началу заболевания был 23,5 (6,9) года.

В соответствии с диагностическими критериями МКБ-10 диагноз «шизофрения» (F20) был поставлен 81 больному, диагноз «шизоаффективное расстройство» (F25) — 25 больным, диагноз «шизотипическое расстройство» (F21), или «вялотекущая шизофрения» согласно отечественной классификации — 8 больным. Их психическое состояние оценивали количественно с помощью шкалы позитивных и негативных симптомов PANSS. Все больные на момент обследования принимали различные психотропные препараты.

Регистрация слуховых вызванных потенциалов (ВП) проводилась в стандартной парадигме oddball с вероятностью предъявления целевого стимула (тон, частота 2 кГц, интенсивность 60 дБ) — 0,2 и нецелевого (тон, частота 1 кГц, интенсивность 60 дБ) — 0,8. Общее число целевых стимулов составляло 30, они подавались бинаурально, с частотой раз в 2 с, межстимульный интервал варьировал в диапазоне 20%. ВП регистрировали на системе картирования Brain Atlas (Bio-logic, США). Эпоха анализа составляла 512 мс, включая 60 мс престимульный интервал. Выделялись волны N100,P200, N100, N200, P300, MMN в 10 отведениях ЭЭГ. Регистрация слуховых ВП подробно описана в работе [2].

Тест на оценку концентрации внимания и исполнительных функций предусматривал серийное отсчитывание от 200 по 2 и по 5 до 100. Учитывали количество правильно выполненных операций в 1 мин.

Молекулярно-генетическое исследование предусматривало отбор венозной крови больных, выделение ДНК и генотипирование с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа маркера С677Т гена MTHFR использовали олигонуклеотидные праймеры с последовательностью: 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3' и 5'-CCTCACCTGGATGGGAAAGATCC-3'. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 2,5 мМ хлорид магния, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,05 ед. полимеразы Taq, 100 нг геномной ДНК, 10 пмоль каждого из праймеров, 10× буфер для Taq-полимеразы. ПЦР проводили по схеме: денатурация в течение 2 мин при 94 °С, далее 30 циклов амплификации (94 °С — 30 с; 60 °С — 25 с; 72 °С — 20 с), последний синтез цепи — 4 мин. Полученную в результате ПЦР последовательность ДНК длиной 146 пары оснований (п.о.) инкубировали с рестриктазой Hinf1 при 37 °С с последующим разделением полученных фрагментов (82 и 64 п.о.) в 8% полиакриламидном геле в течение 1 ч при 240V. Аллелю С соответствовал интактный фрагмент длиной 146 п.о.; аллелю Т — фрагмент, включающий сайт рестрикции. Для анализа полиморфизма 844ins68 CBS использовали праймеры со следующей последовательностью: 5'-GTTGTTAACGGCGGTATTGG-3' и 5'- GTTGTCTGCTCCGTCTGGTT-3'. Реакционная смесь объемом 15 мкл содержала 2,5 мМ хлорид магния, 0,2 мМ каждого dNTP, 0,05 ед.полимеразы Taq, 100 нг геномной ДНК, 10 пмоль каждого из праймеров, 10× буфер для Taq-полимеразы. ПЦР проводили по схеме: денатурация в течение 2 мин при 95 °С, далее 30 циклов амплификации (94 °С — 30 с; 60 °С — 25 с; 72 °С — 25 с), последний синтез цепи — 5 мин. Полученные фрагменты ДНК разделяли в 8% полиакриламидном геле в течение 1,5 часа при 240 V. Длина аллелей составляла 252 п.о. (аллель Ins+) и 184 п.о. (аллель Ins–).

При статистической обработке данных нейрофизиологического и нейропсихологического исследований использовали обобщенную линейную модель многомерного ковариационного анализа. При исследовании параметров вызванных потенциалов на первом этапе в качестве зави-

[1]Здесь и далее в скобках приведены значения стандартного отклонения.

***Таблица 1.*** **Величины латентного периода (мс) волны N100 в зависимости от генотипа 844ins68 ЦБС у женщин и мужчин, больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра**

| Отведения | Женщины | | Мужчины | |
|---|---|---|---|---|
| | Генотипы ЦБС | | | |
| | Ins– (*n*=48) | Ins+ (*n*=8) | Ins– (*n*=42) | Ins+ (*n*=8) |
| F3 | 119,9 (21,2) | 105,7 (13,2)* | 123,8 (21,1) | 131,0 (21,9) |
| F7 | 120,5 (23,0) | 108,2 (15,2) | 124,5 (23,2) | 119,0 (12,7) |
| F4 | 121,5 (18,5) | 103,7 (9,5)** | 118,3 (19,7) | 121,0 (16,7) |
| F8 | 125,4 (22,3) | 108,7 (17,1)*** | 119,1 (22,9) | 127,2 (17,9) |

*Примечание.* * — различия значимы на уровне тенденции ($p$=0,07); ** — различия значимы ($p$=0,01); *** — различия значимы ($p$=0,04).

симой переменной рассматривали композитный индекс, включающий латентности или амплитуды волн во всех отведениях, а независимым фактором являлся генотип. При обнаружении значимого эффекта генотипа проводили серию анализов с использованием композитного индекса, включающего латентности или амплитуды волны раздельно в лобных (F), центральных (C), височных (T) и теменных (P) отведениях. При наличии ассоциации проводили апостериорный анализ для определения связи между генотипом и параметрами волны. На всех этапах в модель вводили в качестве ковариат возраст и выраженность клинических симптомов, которые оценивали количественно с помощью шкалы PANSS.

## Результаты и обсуждение

Построение модели, в которой в качестве зависимой переменной использовали величины латентности и амплитуды регистрируемых волн, а независимой — генотипы МТГФР, не выявило ассоциации между измеряемыми нейрофизиологическими показателями и генетическими вариантами МТГФР[2]. При проведении анализа с использованием в качестве независимой переменной генетического варианта ЦБС также не было выявлено его эффекта, однако при введении половой принадлежности в качестве фиксированного фактора было установлено взаимное влияние пола и генетического варианта на композитный индекс на уровне тенденции ($p$=0,13). Далее анализ был проведен раздельно для лобных, центральных, височных и теменных отделов, при этом пол был включен в качестве фиксированного фактора наряду с генотипом. Обнаружено совместное влияние пола и генотипа на вариативность латентности волны N100 в лобных отведениях справа: F4 (F=4,2; $p$=0,04) и F8 (F=4,3; $p$=0,04). Эти различия были выявлены у женщин, но не у мужчин. Для отведения F3 была обнаружена тенденция к ассоциации (F=3,2; $p$=0,07), однако не достигающая принятого уровня значимости. В отведении F7 эффекта двух указанных выше факторов на латентность волны обнаружено не было. Как показал апостериорный анализ, у женщин с генотипом Ins+ величина латентного периода была меньше, чем у носительниц генотипа Ins– (табл. 1). Как уже упоминалось ранее, генотип Ins+ связывают с более высокой активностью фермента ЦБС. Можно предположить, что риск повышения уровня гомоцистеина в этом случае меньше, чем в присутствии генотипа Ins–. Ранее было показано, что повышенное содержание гомоцистеина связано с когнитивным снижением, в том числе и изменением параметров среднелатентных компонентов N1 и P2 вызванных потенциалов, при разных патологических состояниях. В одном из исследований были изучены полиморфизм C677T гена МТГФР и особенности зрительных вызванных потенциалов у больных мигренью [10]. Оказалось, что значения амплитуды волн N100-P100 были ниже у гомозиготных носителей низкоактивного аллеля T, для которых характерно повышенное содержание гомоцистеина. В другой работе исследовали зрительные вызванные потенциалы у больных с неврологическими синдромами, вызванными дефицитом витамина B12. У всех больных было выявлено повышенное содержание гомоцистеина, а у половины из них зарегистрировано снижение латентного периода волны P100 [14]. В нашем исследовании показано, что генетический вариант ЦБС может оказывать влияние на длительность латентного периода волны N100 слуховых вызванных потенциалов у больных шизофренией. Следует отметить, что у больных шизофренией отмечено снижение амплитуды этой волны по сравнению с психически здоровыми людьми. При этом величина амплитуды зависит от типа клинического синдрома [3], а также выраженности негативных симптомов и эффективности выполнения нейропсихологических тестов, оценивающих внимание и исполнительные функции [4]. Учитывая эти данные, мы также изучили связь между полиморфизмом ЦБС и результатами теста на оценку внимания и исполнительных функций. Анализ связи между генотипами и результатами теста выявил ассоциацию между полиморфизмом 844ins68 и числом верно выполненных операций при выполнении теста (F=5,8; $p$=0,02). Как и в предыдущем анализе, ассоциация была выявлена только в группе женщин. Больные с генотипом Ins+ выполняли тест более успешно, чем с генотипом Ins– (табл. 2).

Таким образом, в нашем исследовании впервые выявлена связь между генотипами 844ins68 ЦБС и показателями внимания, измеренными с помощью метода вызванных потенциалов и нейропсихологического тестирования. Полученная ассоциация обнаружена только у женщин. Эти данные находятся в соответствии с полученными нами ранее результатами исследования распределения генотипов 844ins68 ЦБС в группе больных шизофренией и психически здоровых людей. Исследование показало, что частота генотипов, содержащих инсерцию (Ins+), выше в группе здоровых людей, иначе говоря, генетический вариант, содержащий инсерцию в нуклеотидной последовательности гена, связан с пониженным риском развития шизофрении. В работе было проведено сравнение показателей внимания у носителей различных генотипов в груп-

[2]Значения латентности и амплитуды у носителей различных генотипов МТГФР доступны по запросу.

***Таблица 2.*** **Число правильных ответов в тесте на концентрацию внимания в зависимости от генотипа 844ins68 ЦБС у женщин и мужчин, больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра**

| Женщины | | Мужчины | |
|---|---|---|---|
| Генотипы ЦБС | | | |
| Ins– (*n*=48) | Ins+ (*n*=8) | Ins– (*n*=42) | Ins+ (*n*=8) |
| 8,9 (4,7) | 15,7 (1,2)* | 14,5 (5,8) | 12,3 (1,5) |

*Примечание.* * — различия значимы ($p$=0,02).

пе больных шизофренией на уровне эндофенотипов этого заболевания, к которым, как известно, относят показатели внимания.

*Работа выполнена при частичной поддержке грантом №08-06-00084а Российского гуманитарного научного фонда.*

## ЛИТЕРАТУРА


1. *Голимбет В.Е.* Молекулярно-генетические исследования познавательных нарушений при шизофрении. Мол биол 2008; 42: 5: 830—839.
2. *Голимбет В.Е., Лебедева И.С., Гриценко И.К.* Связь полиморфизма генов серотонинергической и дофаминергической систем с вызванными потенциалами (компонент Р300) у больных шизофренией и их родственников. Журн неврол и психиат 2005; 105: 10: 35.
3. *Лебедева И.С., Каледа В.Г., Бархатова А.Н.* Нейрофизиологические характеристики когнитивных функций у больных с первым приступом эндогенного психоза юношеского возраста. Журн неврол и психиат 2007; 107: 2: 12—20.
4. *Boutros N.N., Brockhaus-Dumke A., Gjini K. et al.* Sensory-gating deficit of the N100 mid-latency auditory evoked potential in medicated schizophrenia patients. Schizophr Res 2009; 113: 2—3: 339—346.
5. *Brown A.S., Susser E.S.* Homocysteine and schizophrenia: from prenatal to adult life. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiat 2005; 29: 1175—1180.
6. *Dekou V., Gudnason V.* Gene-environment and gene-gene interaction in the determination of plasma homocysteine levels in healthy middle-aged men. Thrombosis and Haemostasis 2001; 85: 67—74.
7. *Gilbody S., Lewis S., Lightfoot T.* Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genetic polymorphisms and psychiatric disorders: a HuGE review. Am J Epidemiol 2007; 165: 1: 1—13.
8. *Golimbet V., Korovaitseva G., Abramova L., Kaleda V.* The 844ins68 polymorphism of the cystathionine beta-synthase gene is associated with schizophrenia. Psychiat Res 2009; 170: 2—3: 168—171.
9. *Lewis S.J., Zammit S., Gunnell D. et al.* A meta-analysis of the MTHFR C677T polymorphism and schizophrenia risk. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 2005; 135B: 1: 2—4.
10. *Magis D., Allena M., Coppola G. et al.* Search for correlations between genotypes and electrophysiological patterns in migraine: the MTHFR C677T polymorphism and visual evoked potentials. Cephalalgia 2007; 27: 10: 1142—1149.
11. *Mattson M.P., Shea T.B.* Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. Trends in Neurosciences 2003; 26: 137—146.
12. *Muntjewerff J.W., van der Put N. et al.* Homocysteine metabolism and B-vitamins in schizophrenic patients: low plasma folate as a possible independent risk factor for schizophrenia. Psychiat Res 2003; 121: 1—9.
13. *Muntjewerff J.W., Kahn R.S., Blom H.J. et al.* Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. Mol Psychiat 2006; 11: 2: 143—149.
14. *Puri V., Chaudhry N., Goel S. et al.* Vitamin B12 deficiency: a clinical and electrophysiological profile. Electromyogr Clin Neurophysiol 2005; 45: 5: 273—284.
15. *Regland B., Johansson B.V., Grenfeldt B. et al.* Homocysteinemia is a common feature of schizophrenia. J Neural Transmission General Section 1995; 100: 165—169.
16. *Susser E., Brown A.S., Klonowski E. et al.* Schizophrenia and impaired homocysteine metabolism: a possible association. Biol Psychiat 1998; 141—143.
17. *Tsai M.Y., Yang F., Bignell M. et al.* Relation between plasma homocysteine concentration, the 844ins68 variant of the cystathionine beta-synthase gene, and pyridoxal-5'-phosphate concentration. Mol Genetics and Metabolism 1999; 67: 352—356.
18. *Wang X.L., Duarte N., Cai H. et al.* Relationship between total plasma homocysteine, polymorphisms of homocysteine metabolism related enzymes, risk factors and coronary artery disease in the Australian hospital-based population. Atherosclerosis 1999; 146: 133—140.
19. *Yi P., Melnyk S., Pogribna M. et al.* Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. J Biol Chem 2000; 275: 29318—29323.