

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

АВЕТЯН ДИАНА ГАГИКОВНА

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ РЕГУЛЯТОРОВ СИНАПТИЧЕСКОЙ
ПЛАСТИЧНОСТИ И АПОПТОЗА ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ
СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:

03.00.03 - "Молекулярная и клеточная биология"

Научные руководители –

член корр. НАН РА, д. б. н., проф. А.С. Бояджян

к.б.н. Г.М. Мкртчян

Ереван 2019

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
СПИСОК СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	12
1.1. ЭТИОЛОГИЯ И СИМПТОМАТИКА ПТСП	12
1.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТОМЕХАНИЗМЫ ПТСП	18
1.2.1 <i>Нейроэндокринные и иммунные расстройства при ПТСП</i>	18
1.2.2 <i>Апоптоз при ПТСП</i>	22
1.2.3 <i>Формирование страха и синаптическая пластичность при ПТСП</i>	24
1.3. МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДОВАНИЯ ПТСП	26
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	32
2.1. СУБЪЕКТЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	32
2.2. ПОЛУЧЕНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ	33
2.2.1 <i>Получение образцов геномной ДНК из периферической крови</i>	34
2.2.2 <i>Определение концентрации ДНК в полученных образцах</i>	34
2.2.3 <i>Оценка целостности и чистоты полученных образцов ДНК</i>	35
2.3. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ДНК	36
2.3.1 <i>Выбор однонуклеотидных полиморфизмов исследуемых генов BCL2, BAX, ANXA5, ANXA11, CPLX2, BDNF, NTNG1, NGF, NGFR, CHN1, FOS, JUN, IER5, TERC и TERT для генотипирования</i>	36
2.3.2 <i>Анализ выбранных полиморфизмов исследуемых генов методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (PCR-SSP)</i>	38
2.3.3 <i>Проведение электрофореза</i>	42
2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ЛЕЙКОЦИТАХ	43
2.5. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ	45
2.5.1 <i>Определение уровня белка Vcl-2</i>	45
2.5.2 <i>Определение уровня белка Вах</i>	46
2.5.3 <i>Определение уровня белка аннексина-А5</i>	46
2.5.4 <i>Определение уровня белка комплексина 2</i>	47

2.6. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ.....	47
2.7. ПРИБОРЫ	48
2.8. РЕАКТИВЫ	49
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	50
3.1. МАРКЕРЫ АПОПТОЗА ПРИ ПТСР	50
3.2. МАРКЕРЫ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ПТСР	58
3.3. ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ ПТСР	65
3.4. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ДЛИНА ТЕЛОМЕР ПРИ ПТСР	67
3.5. ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ ГЕНОМНЫХ ВАРИАЦИЙ ПРИ ПТСР	73
3.5.1. Анализ и аннотация геномных вариаций.....	74
3.5.2. Дифференциальный анализ экспрессии генов	77
3.5.3. Анализ сети взаимодействия исследуемых генов/белков	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	89

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ПТСР – Посттравматическое стрессовое расстройство
- DSM-V (Diagnostic and statistical manual of mental disorders, fifth edition) – Диагностико-статистическое руководство по психическим заболеваниям, 5-е издание
- МКБ-10 (International statistical classification of diseases and related health problems (ICD-10), 10th edition) – Международная классификация болезней, 10-е издание
- SCID-I (Structured Clinical Interview) – Структурное клиническое диагностическое интервью
- CAPS (Clinician-Administered PTSD Scale) – Клиническая диагностическая шкала
- GWAS (genome-wide association studies) – исследование полногеномных ассоциаций
- BCL2 – В-клеточная лимфома 2
- BAX – Bcl-2 ассоциированный белок X
- ANXA5 – аннексин-A5
- ANXA11 – аннексин-A11
- TERT – теломеразная обратная транскриптаза
- TERC – теломеразная РНК
- CPLX2 – комплексин 2
- NGF – фактор роста нервов
- NGFR – рецептор фактора роста нервов
- BDNF – нейротрофический фактор мозга
- NTNG1 – нетрин G1
- CHN1 – химерин 1
- FOS – c-Fos протоонкоген
- JUN – c-Jun протоонкоген
- IER5 – немедленный ранний ответ 5
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер
- ЦНС – центральная нервная система
- мПФК – медиальная префронтальная кора головного мозга
- IL – интерлейкин
- TNF- α – фактор некроза опухоли – α
- INF- γ – интерферон- γ
- MCP-1 – моноцитарный хемотаксический протеин-1

КРГ – кортикотропин-рилизинг гормон
АКТГ – адренкортикотропный гормон
ДГЭА – дегидроэпиандростерон
ДГЭАС – дегидроэпиандростерон сульфат
ГГН – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
УФ – ультрафиолетовый
ЭФ – электрофорез
PCR-SSP – полимеразная цепная реакция с аллель-специфичными праймерами
SNP (single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм
оДТЛ – относительная длина теломер в лейкоцитах
MMqPCR (monochrome multiplex quantitative PCR) – монохромный мультиплексный количественный PCR
scg (single copy gene) – ген, представленный одной копией в геноме
ББВ – белок-белковые взаимодействия
ЗЛ – здоровые лица
Odds ratio (OR) – отношение шансов
CI (confidence interval) – доверительный интервал

СПИСОК СИМВОЛОВ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

A – оптическая плотность
M – среднее арифметическое значение
m – средняя квадратическая ошибка
 σ – среднее квадратическое отклонение
 χ^2 – критерий Пирсона
p – доверительная вероятность
 $p_{corrected}$ – доверительная вероятность, скорректированная с помощью поправки множественного сравнения Бонферрони
 $p_{nominal}$ – доверительная вероятность, не скорректированная с помощью поправки множественного сравнения Бонферрони

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР, МКБ-10 код: F43.1; DSM-V код: 309.81) – это комплексное, тяжелое, хроническое психическое заболевание, которое возникает как затянувшийся ответ на событие исключительно угрожающего или катастрофического характера. Для хронических стадий ПТСР характерно клинически значимое тяжелое эмоциональное состояние, снижение адаптивных возможностей организма, нарушение социальной, профессиональной и других важных сфер жизнедеятельности, а также способности к усвоению информации. У многих больных возникает зависимость от алкоголя и наркотиков, что в ряде случаев становится причиной десоциализации и суицидальных исходов. Ассоциированные с заболеванием биомаркеры до настоящего времени не идентифицированы; болезнь выявляется лишь на поздних этапах развития, а ее лечение исключительно симптоматическое [Тарабрина, 2001; Волошин, 2004; Miao et al., 2018; PTSD Alliance, 2019].

В среднем в мире распространенность ПТСР колеблется в диапазоне 1-14%. Согласно статистическим данным, 70% населения Земли сегодня подвергается воздействию факторов, способствующих развитию ПТСР, и 20% из них заболевают им. При этом установлено, что каждый год число больных ПТСР возрастает на 3.6% [АРА, 1994; Тарабрина, 2001; PTSD Alliance, 2019]. Таким образом, очевидно, что ПТСР представляет огромную угрозу современному обществу, являясь одной из важных и требующих безотлагательного решения проблем здравоохранения и социально-экономической сферы в целом. Исследование ПТСР имеет особо важную роль для Армении, поскольку значительная часть населения страны длительное время находилась в способствующих развитию данной патологии экстремальных условиях – землетрясение, война и депортация (беженцы).

Недавние исследования показывают, что клинически ПТСР проявляется не только в форме психического расстройства, но и приводит к соматическим нарушениям, в первую очередь – сердечно-сосудистой этиологии. В частности, была обнаружена ассоциация между симптомами ПТСР и ишемической болезнью сердца [Edmondson et al.,

2013; Kibler et al., 2018]. Кроме того, ПТСР ассоциировано также с легочными заболеваниями [Abrams et al., 2015], повышенным артериальным давлением, ожирением, дислипидемией и сахарным диабетом [Koch & Distler, 2007; Davis et al., 2008; Graves & Kayal, 2009; Hori & Kim, 2019].

ПТСР характеризуется также ослаблением когнитивных функций: согласно литературным данным, это состояние может быть обусловлено, в частности, апоптозом и/или нарушением синаптической пластичности [Seal et al., 2016].

Синаптическая пластичность – это возможность изменения силы связи между двумя нейронами или синапсами в ответ на активацию постсинаптических рецепторов. Эти явления становятся триггерами структурных и функциональных изменений синапсов, которые лежат в основе долговременной потенциации (LTP). Таким образом, синаптическая пластичность выступает в качестве основного фактора в процессе обработки информации в мозге и играет важнейшую роль в обеспечении высших когнитивных процессов, таких как обучение и память [Nathan et al., 2011; Andero & Ressler, 2012]. Синаптическая пластичность легко нарушается при воздействии хронического стресса, что существенно отражается на когнитивных функциях [He et al., 2018].

При некоторых психических расстройствах, таких как ПТСР, в процессах обучения и памяти воспоминания о страхе имеют решающее значение. Задержка реакции на страх, наряду с дисфункцией памяти, рассматривается как важный патогенный фактор данного заболевания [Andero & Ressler, 2012; Flor & Nees, 2014]. В исследованиях нервной системы на доступных моделях ПТСР в развитии и сохранении основных симптомов заболевания центральная роль отводится миндалине, гиппокампу и медиальной префронтальной коре головного мозга (мПФК) – важным областям головного мозга, связанным с эмоциями, обучением и памятью, в которых синаптическая пластичность играет решающую роль в передаче нервного импульса [Chhatwal et al., 2006; Pace & Heim, 2011; Burghardt et al., 2012; Hoffman et al., 2014]. Предполагается также, что миндалина становится гиперчувствительной при симптомах провокации или обучении страху, что также соответствует более выраженному проявлению признаков ПТСР [Goldstein et al., 1996; Sigurdsson et al., 2007]. Показано, что мПФК имеет пониженную чувствительность к реакциям, связанным как с травмой, так и с другими негативными раздражителями, а

слабый ответ обусловлен более высокой степенью выраженности симптомов. Известно также, что гиппокамп гипер- или гипоактивирован в зависимости от типа задачи и в некоторых случаях может подвергаться компенсаторным изменениям [Heldt et al., 2007; Siwak-Tapp et al., 2007]. Структурные исследования нейровизуализации выявили уменьшение объема гиппокампа у больных ПТСР, что может служить как маркером, способствующим развитию заболевания, так и его следствием [Lindauer et al., 2005; Kitayama et al., 2005]. Сведения об объеме миндалина являются более противоречивыми, так как при ПТСР наблюдаются как малый, так и большой объем этой структуры [Mogey et al., 2012; Kuo et al., 2012]. Таким образом, можно прийти к заключению, что механизмы, которые вызывают указанные морфологические и функциональные изменения у пациентов с ПТСР, все еще недостаточно изучены. В частности, одним из таких механизмов возникновения и развития заболевания может быть апоптоз.

Предполагается, что психосоциальный стресс и дистресс способствуют ускорению теломер посредством хронической активации соответствующих биологических процессов, включая окислительный стресс, воспаление и снижение активности теломеразы [Epel et al., 2004]. Теломеры являются защитными некодирующими участками на концах хромосом и участвуют в поддержании геномной стабильности, регуляции экспрессии генов и предотвращении хромосомных слияний [Weinrich et al., 1997; Chan & Blackburn, 2004]. Они могут укорачиваться во время повторных клеточных делений, старения и в ответ на некоторые факторы окружающей среды, такие как психологический [Epel et al., 2004] и физиологический стресс [Lindqvist et al., 2015], курение, ожирение и преклонный возраст родителей [Morla et al., 2006; Malaspina et al., 2014]. Недавние исследования показывают, что длина теломер может служить биомаркером ускоренного старения и повышенного риска раннего развития хронических заболеваний [Roberts et al., 2017]. Однако точные механизмы, лежащие в основе данных процессов, недостаточно изучены.

На протяжении последнего десятилетия биологические исследования ПТСР были сосредоточены в направлении трех основных систем (нервная, эндокринная и иммунная), которые формируют основу физиологической реакции на стресс. Наряду с этим, эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что, помимо факторов окружающей

среды, в развитии ПТСР важную роль играет также наследственная предрасположенность и заболевание является полигенным по природе. Однако вопрос о генах, вовлеченных в патогенез болезни, до настоящего времени остается недостаточно изученным, а молекулярно-генетические патомеханизмы развития заболевания еще не выяснены. Вместе с тем, исследование роли синаптической пластичности, апоптоза и ускоренного старения при ПТСР позволит пролить свет на этиологию и патогенез данной патологии, что является важной предпосылкой для разработки объективных диагностических критериев и лечения данного заболевания.

Цель и задачи исследования

Цель настоящей работы заключалась в выяснении роли молекулярно-генетических регуляторов синаптической пластичности, апоптоза и ускоренного клеточного старения в патогенезе развития посттравматического стрессового расстройства.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- выявление функциональных полиморфизмов генов, кодирующих маркеры синаптической пластичности, апоптоза и регуляции длины теломер у больных ПТСР и здоровых лиц;
- выявление различия между уровнями исследуемых белков, маркеров синаптической пластичности и апоптоза у пациентов и контрольной группы;
- установление степени ассоциации между определенными генотипами функциональных генетических полиморфизмов и уровнями исследуемых белков;
- выяснение характера изменения относительной длины теломер в лейкоцитах больных ПТСР.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В работе была исследована ассоциация ПТСР с однонуклеотидными полиморфизмами генов, кодирующих маркеры апоптоза и синаптической пластичности, а также основными компонентами теломеразы – TERT и TERC. Показано, что полиморфизмы генов, вовлеченных в процесс апоптоза (полиморфизмы rs956572 и

rs1801018 гена *BCL2*, rs1057369 гена *BAX*, rs1049550 гена *ANXA11*), ассоциированы с риском развития ПТСР. Выявлено также, что гены, вовлеченные в процесс синаптической пластичности, ассоциированы как с высоким (полиморфизмы rs1366116 гена *CPLX2*, rs6330 гена *NGF*), так и с пониженным (rs6265 гена *BDNF*, rs4839435 гена *NGF*, rs734194 гена *NGFR*) риском развития этого заболевания. Наконец, выявлено, что полиморфизмы rs7101 и rs1063169 гена *FOS*, кодирующего транскрипционный фактор c-Fos, модулируют риск развития ПТСР.

Установлено, что для ПТСР, по сравнению с нормой, характерны низкое соотношение Вах/Vcl-2, содержание белков аннексина-A5 и комплексина 2 в периферической крови, что может свидетельствовать о нарушении процессов апоптоза и синаптической пластичности.

Нами также показано, что патогенез ПТСР ассоциирован с укорочением относительной длины теломер в лейкоцитах больных. При этом, для носителей минорного аллеля локуса rs734194 гена *NGFR* характерны относительно длинные теломеры, что указывает на протекторную роль данного полиморфизма при ПТСР.

Фундаментальная значимость данной работы состоит в том, что ее результаты в значительной степени обогащают и дополняют существующие представления о молекулярных этиопатомеханизмах ПТСР как в целом, так и на уровне нарушений, связанных с синаптической пластичностью и апоптозом, с акцентом на признаки ускоренного старения. Результаты настоящего исследования также существенно расширяют современные знания о роли генетических факторов, ответственных за развитие ПТСР: нами выявлены новые кандидатные гены, лежащие в основе наследственной предрасположенности и обуславливающие специфическое течение рассматриваемой патологии.

Практическое значение полученных в рамках данного исследования результатов связано с их дальнейшим использованием в процессе разработки и последующего применения новых эффективных подходов дифференциальной диагностики, основанных на методах доказательной медицины, и лечения ПТСР.

Объем и структура работы

Работа изложена на 117 страницах машинописного текста, иллюстрирована 13 таблицами, 14 рисунками. Состоит из списка использованных сокращений и обозначений, введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (268 источников).

Апробация работы

Основные результаты настоящего исследования были доложены и обсуждены на III международной конференции молодых ученых «Перспективы развития молекулярной и клеточной биологии» (Армения, 2012), конференции молодых ученых «Новые аспекты молекулярной биотехнологии и биохимии» (Армения, 2013), международном симпозиуме по нейронауке и биологической психиатрии ПТСР «Стресс и Поведение: Ереван-2013» (Армения, 2013), 27-м, 28-м и 29-м конгрессах Европейского колледжа по нейропсихофармакологии (Германия, 2014; Нидерланды, 2015; Австрия, 2016), конгрессе Всемирной ассоциации по стрессовым и тревожным расстройствам (Германия, 2017), семинарах и заседаниях ученого совета Института молекулярной биологии НАН РА (2011-2019).

Публикации

Основные результаты настоящего исследования отражены в 15 научных работах: две главы в изданных зарубежом книгах, пять статей в зарубежных журналах, одна статья в отечественном журнале и семь публикаций в материалах международных конференций.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. ЭТИОЛОГИЯ И СИМПТОМАТИКА ПТСР

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР, МКБ-10 код: F43.1; DSM-V код: 309.81) – это комплексное, тяжелое психическое заболевание с хроническим течением, относящееся к группе «травма и стресс-зависимые расстройства». Горовиц и др. в 1980 г. предложили выделить ПТСР в качестве самостоятельного синдрома. В дальнейшем группа авторов во главе с Горовицем разработала диагностические критерии ПТСР и это заболевание было включено как отдельная нозологическая категория в Диагностико-статистическом руководстве по психическим заболеваниям сначала для американских классификаций психических заболеваний (DSM-III и DSM-III-R) [APA, 1980; 1987], а с 1995 г. в Международную классификацию болезней и проблем, связанных со здоровьем, основного диагностического стандарта в европейских странах [WHO, 1992]. Согласно МКБ-10, ПТСР «возникает как отставленная и затяжная реакция на стрессовое событие или ситуацию исключительно угрожающего или катастрофического характера, которая в принципе может вызвать общий дистресс почти у каждого человека».

ПТСР возникает у индивида под воздействием экстремальных условий или чрезвычайных ситуаций, которые, угрожая жизни или здоровью как его самого, так и его близких, требуют превосходящих его возможности механизмов совладания, коренным образом нарушают чувство безопасности индивида, вызывают интенсивный страх, беспомощность или ужас. К ситуациям, индуцирующим развитие заболевания, относятся стихийные бедствия, войны, террористические и криминальные акты, природные катастрофы, автомобильные аварии, авиационные катастрофы, физическое насилие, изнасилование и др. (табл. 1.1). Причины, вызывающие ПТСР, не ограничиваются вышеуказанным списком. К посттравматическому стрессовому расстройству может привести любое событие, представляющее реальную или потенциальную угрозу жизни и здоровью, которое первоначально вызвало состояние сильного эмоционального потрясения и/или физического шока [Тарабрина, 2001; Волошин, 2004; Miao et al., 2018; PTSD Alliance, 2019].

Сложно определить прогноз при ПТСР, так как условия возникновения и развития расстройства сильно различаются. Эпидемиологические исследования свидетельствуют, что у 50 – 100% пациентов, страдающих ПТСР, наблюдаются такие нарушения как невроз тревоги, депрессия, медикаментозная, алкогольная или наркозависимость, психосоматические расстройства. У пациентов с ПТСР особую проблему представляет высокий показатель самоубийств или попыток самоубийств.

Таблица 1.1. Частота различных травматических событий и последующего развития ПТСР [Тарабрина, 2001; Picking up the peaces, 2019; PTSD Alliance, 2019].

Характер травмы	Частота травмы, %	Частота развития ПТСР, %
Изнасилование	5.5	55.5
Война	3.2	38.8
Плохое обращение в детстве	4.0	35.4
Пренебрежение в детстве	2.7	21.8
Сексуальное домогательство	7.5	19.3
Угроза применения оружия	12.9	17.2
Телесное насилие	9.0	11.5
Несчастные случаи	19.4	7.6
Свидетели насилия, несчастного случая	25.0	7.0
Пожар/стихийное бедствие	17.1	4.5
Другие травмы	2.5	23.5
Наличие какой-либо травмы	60.0	14.2
Другие угрожающие жизни ситуации	11.9	7.4

Распространенность ПТСР среди популяции зависит от частоты травматических событий. Так, можно говорить о травмах, типичных для определенных политических режимов, географических регионов, в которых особенно часто происходят природные катастрофы, и т. п. По данным исследований Национального повторного обследования

коморбидности (The National Comorbidity Survey Replication NCS-R), проведенных в США, распространенность (показатель lifetime prevalence) ПТСР в течение жизни среди взрослых составляет 6.8%, а распространенность ПТСР в течение года – 3.5% [Kessler et al., 2005a; Kessler et al., 2005b]. В популяции распространенность ПТСР в течение жизни у женщин отмечается чаще (9.7%), чем у мужчин (3.6%), а распространенность ПТСР в течение года составляет 5.2% и 1.8%, соответственно. Соответствующие эпидемиологические исследования, проведенные среди ветеранов вьетнамской войны, позволили установить ПТСР у 30.9% мужчин и 26.9% женщин; среди ветеранов войны в Персидском заливе в среднем распространенность ПТСР составляет 10.1% [Kulka et al., 1990; Kang et al., 2003].

Широкое обследование населения показало, что в среднем в мире распространенность ПТСР колеблется в диапазоне 1 – 14% с вариабельностью, связанной с особенностью популяции. Обследование индивидов из группы риска (участники боевых действий, жертвы/очевидцы террористических актов, массовых сцен насилия, убийств, стихийных бедствий или катастроф) дало очевидное повышение норм распространенности диагноза до 58%. При этом частота возникновения ПТСР, по сравнению, например, с 80-х гг. 20 века значительно возросла. Согласно статистическим данным, 70% населения Земли подвергается сегодня воздействию факторов, способствующих развитию ПТСР, и 20% из них заболевают им. При этом установлено, что каждый год число больных ПТСР возрастает на 3.6%, и согласно прогнозам через 10 лет 8 – 10% населения в мире составят больные ПТСР [АРА, 1994; Тарабрина, 2001; PTSD Alliance, 2019].

Ситуация в Армении также проблемная, поскольку значительная часть населения длительное время находилась в экстремальных ситуациях, способствующих развитию этого заболевания, таких как землетрясение, война и депортация (беженцы).

Клиническая картина ПТСР

Индущирующее ПТСР травматическое событие оставляет неизгладимый след в психике индивида, далее постоянно и настойчиво повторяется в воображении больного. В результате, для хронических стадий ПТСР характерно клинически значимое тяжелое эмоциональное состояние, нарушение социальной, профессиональной и других важных

сфер жизнедеятельности, способности к усвоению информации, снижение адаптивных возможностей. Болезнь выявляется лишь на поздних этапах развития, лечение исключительно симптоматическое. У больных отмечаются хроническое чувство отчуждения от других людей, отсутствие реакции на окружающее, ангедония, повышенная вегетативная возбудимость, бессонница. Эмоциональность больных характеризуется притупленностью, «оцепенелостью». Больные боятся и избегают всего, что напоминает о пережитой ими психической травме. Больные ПТСР характеризуются асоциальным поведением, агрессивностью, склонностью к насилию, у многих возникают долгосрочные проблемы личностного и интерперсонального характера, что проявляется в отстраненности от других, супружескими конфликтами, разводами, потерей работы (табл. 1.2) [Тарабрина, 2001; Волошин, 2004; Auhéméry, 2018].

Типичные признаки ПТСР:

Флешбэк – в воспоминаниях, человек может чувствовать себя или действовать так, как будто травмировавшее событие происходит снова. Воспоминание может быть временным, и какая-то связь с настоящим моментом может быть сохранена, или человек может потерять осознание того, что происходит вокруг него, полностью возвращаясь к травмировавшему событию. Флешбэки могут проявляться как в ночных кошмарах, так и наяву.

Избегание и эмоциональная отчужденность. Люди, живущие с ПТСР, как правило, избегают запахов, вкусов, осязания или любого ощущения, которое напоминает им об испытанном ими травматическом событии. Как результат, люди с ПТСР могут избегать людей (например, друзей, родственников и коллег), и мест (например, место работы или дом), как способ решения проблемы, чтобы предотвратить переживание травмирующих воспоминаний. Это может привести к чувству отдаленности от людей, потере интереса к деятельности, которую они когда-то любили, и чувству, что их будущее мрачно (например, они не в состоянии думать о будущем или строить планы на будущее).

Таблица 1.2. Основные симптомы ПТСР.

<i>Повторные переживания травмирующего события (re-experiencing)</i>
<ul style="list-style-type: none">• Пугающие воспоминания о ситуации нападения, катастрофы. Воспоминания возникают внезапно и сопровождаются оцепенением, потливостью, сильным сердцебиением.• Кошмарные сновидения, связанные с пережитой экстремальной ситуацией, бессонница.• Различные ощущения интенсивного психологического дистресса и/или физического дискомфорта при напоминании о травмирующем событии.
<i>Симптомы избегания (avoidance and numbing)</i>
<ul style="list-style-type: none">• Старание избегать воспоминаний, мыслей и чувств о травматическом событии.• Старание избегать какой-либо деятельности, ситуации и людей, которые могут напоминать о пережитом травматическом событии.
<i>Симптомы негативного изменения в настроении и когнитивных процессах (negative alterations in cognition symptoms)</i>
<ul style="list-style-type: none">• Невозможность воспоминания деталей травматического события.• Искаженные суждения о причинах травматического события, которые заставляют индивида винить себя или других.• Постоянные негативные эмоции (страх, гнев, вина, стыд и др.).• Снижение интереса к повседневным жизненным событиям.• Чувства эмоциональной пустоты и отчужденности от окружающих.
<i>Симптомы повышенной возбудимости нервной системы (hyperarousal)</i>
<ul style="list-style-type: none">• Трудности с засыпанием и/или беспокойный и поверхностный сон.• Раздражительность и приступы гнева.• Трудности при концентрации внимания. <p>Частое (постоянное) пребывание в настороженном состоянии. Избегание всего того, что так или иначе может напомнить ситуацию травмы, т.к. не может справиться с появляющимися тягостными ощущениями;</p> <ul style="list-style-type: none">• Отсутствие или притупленная реакция на окружающее и ангедония (отсутствие удовольствия, наслаждения).

Нервозность. Люди с ПТСР часто действуют, как если бы им постоянно угрожала травма, которая явилась причиной их болезни. Могут иметься трудности концентрации внимания, невозможность сосредоточиться. Человек с ПТСР может ходить, озираясь по сторонам – проявление гипербдительности. Часты проблемы со сном – трудности с засыпанием, раннее пробуждение, характерны ночные кошмары. Имеет место также постоянная бдительность и состояние постоянного ожидания угрозы. Состояние часто осложняется соматическими расстройствами и заболеваниями – в основном со стороны нервной, сердечно-сосудистой, пищеварительной и эндокринной систем [APA, 1994, DSM-IV-TR, 2000; Тарабрина, 2001; Волошин, 2004; Edmondson et al., 2013; Kibler et al., 2018].

В последнее время принято различать острое расстройство – если длительность симптомов меньше 3-х месяцев и хроническое расстройство – если длительность симптомов составляет 3 и более месяцев, а также расстройства с отсроченным началом – если симптомы начинаются по меньшей мере через 6 месяцев после воздействия травматического стресса.

Основным клинико-психологическим методом является *клиническая диагностическая шкала для DSM-V (Clinician-Administered PTSD Scale for DSM-V – CAPS-5)*.

Шкала клинической диагностики CAPS является золотым стандартом оценки ПТСР. Структурированное клиническое интервью CAPS-5 состоит из 30 пунктов, которые могут быть использованы для диагностики тяжести текущего ПТСР как в течение прошлого месяца, так и в посттравматическом периоде в целом, а также для дифференцированной оценки симптоматики в течение последней недели. Применение методики не только дает возможность оценить по 5-бальной шкале каждый симптом с точки зрения частоты и интенсивности проявления, но и определить достоверность полученной информации [Weathers & Litz, 1994; Blake et al., 1995; Weathers et al., 2013].

1.2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПАТОМЕХАНИЗМЫ ПТСР

1.2.1 Нейроэндокринные и иммунные расстройства при ПТСР

За последние три десятилетия, биологические исследования ПТСР были сосредоточены в направлении двух основных гормональных систем, которые формируют основу физиологической реакции на стресс: гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГН) и симпато-адренормедулярная (САМ) системы. Внимание к этим системам вытекает из фактов:

1. ПТСР развивается после воздействия травматических и стрессовых событий
2. глюкокортикоиды и катехоламины являются «гормонами стресса», которые могут регулировать ответы на травму [Pace & Heim, 2011].

В нескольких исследованиях также было описано о повышенной активности в миндалине (амигдала) у людей с ПТСР по отношению к здоровым людям (рис. 1.1).

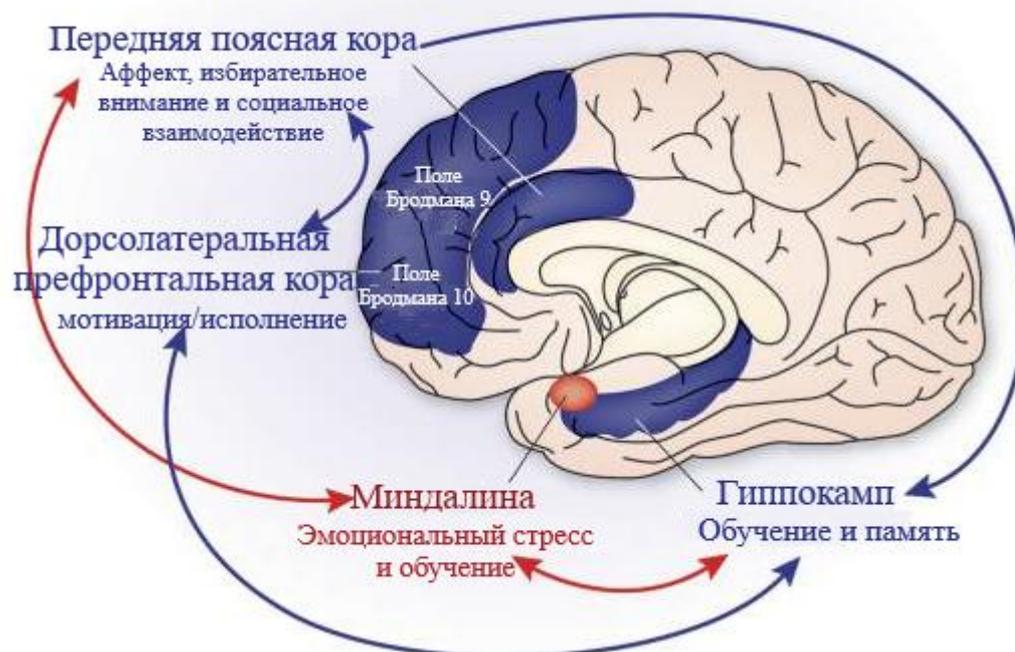


Рисунок 1.1. Области головного мозга, вовлеченные в патофизиологию ПТСР. Кортиколимбическая система состоит из нескольких областей головного мозга, которые включают ростральную переднюю поясную кору, гиппокамп и базолатеральную миндалину. Передняя поясная кора играет центральную роль в обработке эмоциональных переживаний на сознательном уровне и выборочных ответных реакций. Эмоционально связанное обучение опосредуется через взаимодействие миндалины и гиппокампа, а мотивационные реакции обрабатываются через дорсолатеральную префронтальную кору [Benes, 2010].

Кортиколимбическая система – это интегративная структура мозга, которая отвечает за многие психические процессы человека: это эмоции, мотивация, воля, обучение и память. Миндалина играет главную роль в обработке эмоций. У людей и животных эта подкорковая мозговая структура связана с формированием как отрицательных, так и положительных эмоций.

Ось ГГН и иммунная система связаны в рамках комплексной системы обратной связи, которая может быть нарушена следующим опытом травматического события, в результате чего имеется риск для физического и психического здоровья.

Когда человек сталкивается со стрессором, гипоталамус производит кортикотропин-рилизинг гормон (КРГ), что приводит к стимуляции гипофиза и синтеза адренкортикотропного гормона (АКТГ), в результате чего происходит стимуляция надпочечников и выброс кортизола и ДГЭА (дегидроэпиандростерон). Кортизол снижает воспалительную активность иммунной системы, и смещает баланс цитокинов, которые синтезируются иммунными клетками, в сторону провоспалительных цитокинов (Th2). Интерлейкин-6 проходит ГЭБ (гематоэнцефалический барьер) и стимулирует ГГН ось, с целью регуляции иммунной деятельности и защиты человека от чрезмерного воспаления [Pace & Heim, 2011].

Роль кортизола в том, чтобы увеличить энергетические ресурсы за счет снижения активности систем организма, включая иммунную систему, а также повышение уровня глюкозы в крови. Кортизол также тормозит острую реакцию на стресс, активируя систему отрицательной обратной связи по оси ГГН и гиппокампу через глюкокортикоидные рецепторы (ГКР) [Raison & Miller, 2003; Sternberg, 2006]. Эти механизмы являются защитными, при остром стрессе, однако, если стрессор является чрезмерным или длительным, адаптация может увеличить риск избыточного воспаления. У здорового человека, существует баланс между лимфоцитами воспалительного/клеточного (Th1) и гуморального (Th2) цитокинов. После воздействия стрессора увеличивается концентрация кортизола и путем связывания с рецепторами глюкокортикоидов в лимфоцитах подавляет Th1 цитокины, в результате чего подавляется воспалительная активность [Raison & Miller, 2003]. Иммунная система также влияет на функцию ГГН оси в целях защиты индивида. Th1 цитокины стимулируют ГГН ось в результате чего увеличивается концентрация

кортизола, и снижается Th1 иммунная активность. Более глубокое понимание отношений между осью ГГН и иммунной системы у людей с ПТСР является существенным, так как сбои могут быть связаны с повышенной заболеваемостью и смертностью у больных ПТСР. Было показано, что хроническое воспаление, оказывает неблагоприятное воздействие на многие системы организма и может привести к хроническим болям, артриту, диабету и сердечно-сосудистым заболеваниям [Koch & Distler, 2007; Davis et al., 2008; Graves & Kayal, 2009; Edmondson et al., 2013; Kibler et al., 2018].

Дегидроэпиандростерон и ДГЭА сульфат (ДГЭАС) производятся корой надпочечников. При нормальных условиях, уровень ДГЭА тесно связан с кортизолом, однако дисбаланс кортизол/ДГЭА может произойти, когда человек испытывает хронический стресс [Kroboth et al., 1999; Raison & Miller, 2003].

ДГЭАС более широко распространен, чем ДГЭА в плазме крови и слюне и имеет эффект на рецепторы глутамата и гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), которые могут способствовать симптомам ПТСР. Дегидроэпиандростерон также модулирует действие иммунной системы, что приводит к сокращению Th1 иммунной активности, подобно кортизолу (рис. 1.2).

Большинство исследований у пациентов ПТСР показывали увеличение уровня провоспалительных цитокинов в плазме, в том числе TNF- α [von Känel et al., 2007; Оганесян и др., 2012], IL-1 β [Spivak et al., 1997; von Känel et al., 2007], IL-6 [Maes et al., 1999], IL-8 [Song et al., 2007] и INF- γ [Woods et al., 2005]. TNF- α и IL-6 стимулируют ГГН ось, в результате чего увеличивается продукция кортизола, тем самым защищая человека от чрезмерного воспаления. В условиях острого стресса, эта система защиты работает, но если стресс является чрезмерным или длительным, эти механизмы регулирования могут быть недостаточны. Если наблюдается низкий уровень кортизола, это может привести к недостаточной сигнализации глюкокортикоидов, вызывая чрезмерный уровень клеточных и провоспалительных цитокинов, а также чрезмерной стимуляцией ГГН оси.

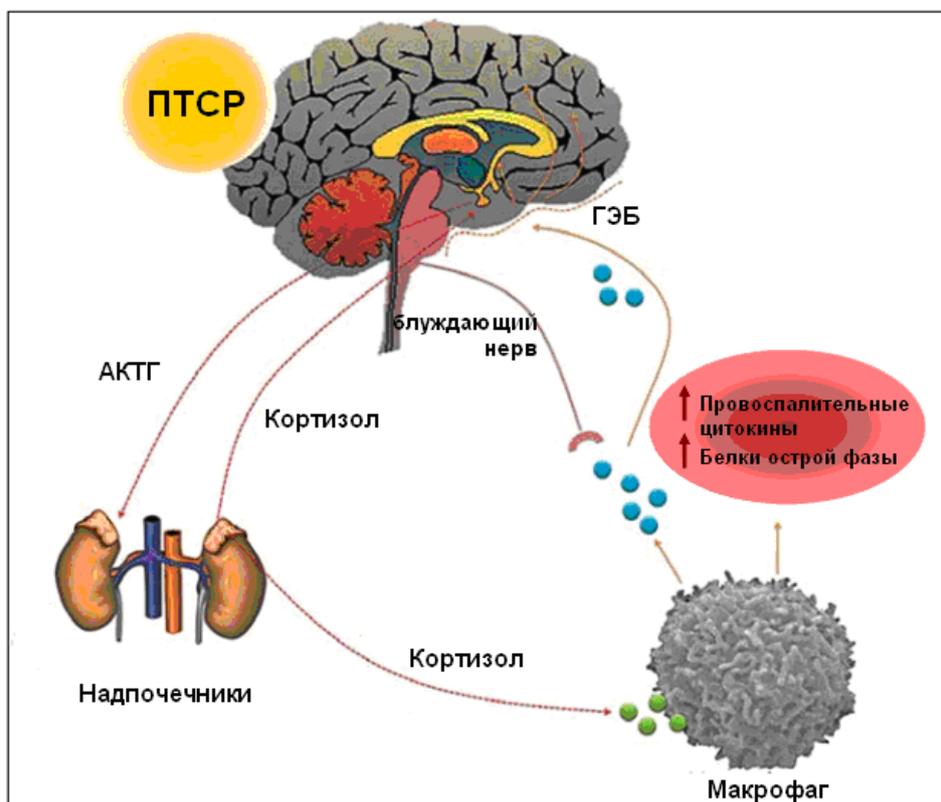


Рисунок 1.2. Нейроиммунные взаимодействия при ПТСР.

Гиперкортизолизм связан с отсутствием надлежащего контроля иммунной системы, что приводит к вялотекущему воспалению, о чем свидетельствует повышенный уровень провоспалительных цитокинов. Эти цитокины, в свою очередь, поступают в мозг через афферентные волокна (например, блуждающего нерва), либо через ГЭБ или через активные транспортные молекулы. Находясь в головном мозге, цитокины участвуют в сигнальном пути, связанном с развитием депрессии, в том числе в последующем производстве и/или высвобождении АКТГ и глюкокортикоидов (кортизола) [Moisés et al., 2010].

На сегодняшний день нет сомнений в серьезном нарушении иммунного статуса организма при ПТСР как на уровне центральной нервной системы (ЦНС), так и на уровне всего организма. При ПТСР наблюдается активация неспецифического клеточного и специфического гуморального компонентов иммунной системы, угнетение специфического клеточного иммунитета, опосредованного Th1, и активация гуморального иммунитета, опосредованного Th2. Характерное для ПТСР нарушение иммунного статуса организма отражается современными воззрениями о единстве нервной и иммунной систем. Однако вопросы, касающиеся молекулярных патомеханизмов, приводящих к наблюдаемой при ПТСР дисфункции иммунного статуса организма, а также того, в какой степени и каким образом нарушение иммунного статуса организма взаимосвязано с нарушениями на уровне структурно-функциональных изменений нейро-трансмиссивных

систем мозга, до настоящего времени остаются открытыми. С одной стороны, характерные для ПТСР низкие уровни глюкокортикоидов [Yehuda et al., 2002; 2011], а также активация ГГН и симпатической нервной системы [Heim et al., 2000; Yehuda, 2002] могут привести к инициации иммунного ответа [Dhabhar & McEwen, 1997], с другой – известно, что иммунная система, являясь регулятором вышеотмеченных звеньев, может сама запускать или усугублять развитие в них патологических процессов по принципу обратной связи [Raison & Miller, 2003].

1.2.2 Апоптоз при ПТСР

Одним из основных эндокринных нарушений, связанных с ПТСР, как было описано ранее, является нарушение функции ГГН оси, которое характеризуется низким уровнем гормонов АКТГ и кортизола [Li et al., 2010b; Eckart et al., 2011]. Ряд исследований показал, что миндалина, гиппокамп и медиальная префронтальная кора головного мозга (мПФК) тесно связаны с возникновением ПТСР [Vermetten et al., 2006]. В частности, мПФК представляет собой наиболее важную структуру контроля реакции миндалины и гиппокампа на стресс, а также в значительной степени способствует модуляции консолидации памяти, путем хранения эмоциональной информации и имеет решающее значение для формирования долговременной памяти, а именно, для модуляции тревоги, страха и агрессии [Sailer et al., 2008; Li et al., 2013].

Было показано, что дисфункция или гиподисфункция гиппокампа является одной из причин психических расстройств, связанных со стрессом, таких как ПТСР. В последнее время структурные исследования нейровизуализации показали, что объем гиппокампа относительно малый у больных ПТСР [Lindauer et al., 2005; Kitayama et al., 2005]. Тем не менее, механизмы, которые вызывают такую атрофию недостаточно хорошо изучены. Предполагается, что механизм апоптоза может быть вовлечен в ПТСР.

Апоптоз представляет собой сложный, генетически контролируемый процесс запрограммированной клеточной гибели, который имеет важное значение для развития, гомеостаза и заболеваемости, и включается в ответ на сигналы, вызванные внешними или внутренними факторами [Yan et al., 2006]. Существуют различные механизмы апоптоза на

основе разных физиологических и патологических раздражителей. Апоптоз может быть вызван двумя основными сигнальными путями: внутренний (митохондриальный сигнальный путь) и внешний (рецептор-зависимый сигнальный путь), которые активируют каспазу-3 и вызывают деградацию белка и нарушают клеточную целостность [Li et al., 2010b; Alani et al., 2013].

Апоптоз является одним из наиболее важных защитных механизмов организма от патогенных микроорганизмов, хотя он играет также важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [Waldmeier & Tatton, 2004]. Активация внутреннего митохондриального пути из-за стресса и последующих морфологических вариаций приводит к атрофии в различных областях головного мозга, особенно гиппокампа, что было обнаружено при остром и хроническом стрессе [Shishkina et al., 2010].

В регуляции апоптоза решающую роль играет семейство белков В-клеточной лимфомы 2 (Bcl-2). Оно включает в себя проапоптотический Bcl-2 ассоциированный белок X (Bax) и анти-апоптотический белок Bcl-2 [Panaretakis et al. 2002]. Некоторые *in vitro* эксперименты показали, что гиперэкспрессия белка Bax может способствовать апоптозу [Matter-Reissmann et al. 2002], в то время как гиперэкспрессия белка Bcl-2 ингибирует апоптоз [Sun et al., 2002]. Таким образом, соотношение Bax/Bcl-2, по-видимому, является решающим параметром в процессе апоптоза [Jarskog et al., 2004].

Bcl-2 белок имеет две основные защитные функции: во-первых, регулирует высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума путем непосредственного взаимодействия с рецептором инозитол 1,4,5-трифосфата [Chen et al., 2004]. Во-вторых, он действует как сенсор окислительно-восстановительного состояния митохондрий путем обнаружения и регулирования митохондриального пула глутатиона. Таким образом предполагается, что способность Bcl-2 связывать глутатион играет центральную роль в его антиоксидантной функции в митохондриях [Zimmermann et al., 2007]. Также Bcl-2 защищает нервные клетки от глутаматергических инсультов, которые, как полагают, приводят к гибели клеток, изменению нейропиля и последующим нарушениям объема мозга. Было показано также, что экспрессия Bcl-2 может быть важным фактором, способствующим выживанию нейронов после повышенного воздействия глутамина. Сообщалось также об увеличении экспрессии Bcl-2 для защиты клеток от вредного

воздействия токсичности глутамина в нервных клетках [Zhong et al., 1993]. С другой стороны, было показано, что экспрессия гена Bcl-2 значительно снижается после воздействия глутамина, что связано с увеличением уровней внутриклеточного нейронального Ca^{2+} и окислительного стресса [Machado-Vieira et al., 2009b; Kumar et al., 2010; Manji, 2008].

До настоящего времени опубликовано лишь небольшое число исследований о молекулярных мишенях, вовлеченных в процесс апоптоза, в частности роли белков семейства Bcl-2 и их потенциальный вклад в этиологию ПТСР; более того, эти работы проведены на животных моделях [Li et al., 2010a; Li et al., 2013].

1.2.3 Формирование страха и синаптическая пластичность при ПТСР

За последние два десятилетия было выяснено, что многие формы синаптической пластичности, которые когда-то считались уникальными для раннего развития, фактически повторяются в мозгу взрослого человека во время обучения. С тех пор огромное количество исследований было сфокусировано на том, чтобы идентифицировать и характеризовать эти различные нейропластичные процессы, а также изучить молекулярные маркеры, которые могут играть роль в обеспечении этой пластичности. Наличие большого числа генов- и молекул-кандидатов, участвующих в каждом из этих процессов, в свою очередь, представляет интерес для идентификации так называемых «главных регуляторов» пластичности. Тем не менее, до сих пор нет точного определения того, что представляет собой «главный регулятор» синаптической пластичности. Также важно отметить, что нет никакого консенсуса относительно каких-либо общих характеристик, которые могут быть использованы для классификации регуляторов пластичности [Maheu & Ressler, 2017].

Синаптическая пластичность может быть в общем определена как изменение структурных особенностей нейронов, которые приводят к изменениям в межнейронной передаче. Такие изменения могут носить долгосрочный или краткосрочный, ультра- или макроструктурный характер; они могут быть ограничены молекулярной реорганизацией

отдельных синапсов, распространяться на нейронные изменения внутренней возбудимости или даже включать генерацию совершенно новых нейронов [Fioravante & Regehr, 2011; McEwen et al., 2012; Ehrlich & Josselyn, 2016]. Считается, что эти различные формы ремоделирования нейронов лежат в основе способности мозга обучаться и запоминать. Фундаментальные исследования, связанные с синаптической пластичностью в этих функциях, показали, что большое количество факторов окружающей среды влияют на различные формы синаптической пластичности [McEwen et al., 2012; Ehrlich & Josselyn, 2016].

Несмотря на то, что исследования полногеномных ассоциаций (genome-wide association studies (GWAS)) позволяют выявить ключевые молекулярные маркеры, способствующие развитию психических расстройств, связанных со стрессом, до настоящего времени не найдены потенциальные терапевтические мишени, которые являются широко вовлеченными в этиологию этих заболеваний [Maheu & Ressler, 2017]. Хотя GWAS и подобные подходы до сих пор не смогли выявить определенные маркеры генетического риска, были предоставлены убедительные данные о том, что многие расстройства связанные со стрессом вызваны нарушением регуляции ряда общих подгрупп клеточных процессов. Среди них часто встречаются процессы, связанные с синаптической пластичностью, которые могут быть представлены в качестве ключевых маркеров риска психических расстройств [Kilaru et al., 2016].

Данные, полученные на животных моделях и исследованиях нейровизуализации человека, позволяют предположить, что одним из основных механизмов ПТСР может быть aberrantная синаптическая пластичность [Sah et al., 2008; Pape & Pare, 2010; Mahan & Ressler, 2012]. Синаптическая пластичность описывает изменения, которые происходят в синапсе с длительной синаптической активностью. Такие изменения носят физиологический, морфологический и молекулярный характер. Предполагается, что синаптическая пластичность лежит в основе обучения и памяти. В поведении больные ПТСР проявляют повышенную чувствительность к стрессу, чрезмерную генерализацию ассоциаций страха и неспособность подавить воспоминания о страхе. Память, связанная со страхом, является наиболее изученной формой памяти. Она формируется в гиппокампе, в базолатеральной миндалине и в латеральной миндалине [Sigurdsson et al., 2007; Mahan &

Ressler, 2012]. Таким образом, нарушения механизмов страха при ПТСР могут указывать на нарушения синаптической пластичности. Имеется много данных о молекулярных механизмах синаптической пластичности, и понимание того, каким образом нарушения синаптической пластичности вовлечены в патомеханизм ПТСР предоставит новые возможности для трансляционных исследований, а также могло бы обеспечить дополнительные потенциальные молекулярные фармакотерапевтические мишени для повышения эффективности когнитивно-поведенческой терапии (cognitive behavioural therapy, CBT) ПТСР.

1.3. МЕХАНИЗМЫ НАСЛЕДОВАНИЯ ПТСР

Уже пол века, как подтверждена роль генетического фактора в этиологии и патогенезе ПТСР, однако еще очень мало известно о механизме последнего, в частности не ясно, почему вследствие травмирующих событий только у некоторых людей развивается ПТСР. Предполагается, что вероятность наследования этой патологии составляет 30 – 40% [Stein, 2002; Young et al., 2002; Segman et al., 2003; Lee et al., 2007; Thakur et al., 2009; Nelson et al., 2009; Kolassa et al., 2010a; Yehuda, 2011; Almlí et al., 2014].

На сегодняшний день, генетические исследования были сосредоточены, в основном, на генах кандидатах, определенных на основе современного понимания нейробиологии ПТСР. В общем, эти исследования показывают сложное взаимодействие между генетическими факторами и факторами окружающей среды. Кроме того, многие из выявленных генетических полиморфизмов расположены в промоторах или других регуляторных областях, а не обязательно в областях кодирования гена [Broekman et al., 2007; Poulton et al., 2008; Amstadter et al., 2009; Norrholm & Ressler, 2009; Cornelis et al., 2010; Amstadter et al., 2012; Bomyea et al., 2012; Domschke, 2012; Mehta & Binder, 2012; Skelton et al., 2012; Digangi et al., 2013]. Таким образом, в механизм развития ПТСР вовлечены следующие гены, которые приведены в таблице 1.3.

Гены-кандидаты серотонинергической системы.

Нарушение регуляции серотонинергической системы мозга связано в патофизиологией ПТСР [Southwick et al., 1994; Anger et al., 1999]; механизм действия

которого является наиболее изученным при ПТСР. Серотонин, среди его многочисленных функций, регулирует эмоциональное реагирование и вообще эмоциональность; кроме того, препараты серотонинергического действия являются первостепенными при лечении тревожных и депрессивных расстройств и, в настоящее время являются единственными медикаментами одобренными Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для ПТСР.

В этой системе наиболее широко изучен полиморфизм, который находится в промоторной области гена *SLC6A4* транспортера серотонина (*5-HTTLPR* rs25531). Данный *5-HTTLPR* полиморфизм содержит два аллеля: S (короткий) и L (длинный), и влияет на транскрипцию *SLC6A4* гена. Так, например, S-аллель уменьшает экспрессию и функциональность гена переносчика серотонина и приводит к уменьшению захвата серотонина [Lesch et al., 1996; Caspi et al. 2003]. Несмотря на то, что основные воздействия этого полиморфизма были описаны [Lee et al., 2005; Thakur et al., 2009], большинство исследований показывает, что риск связан с генотипом (в основном носителей S-аллелей) и наличием травмы [Kilpatrick et al., 2007; Grabe et al., 2009; Koenen et al., 2009; Xie et al., 2009, 2012; Kolassa et al., 2010a; Wang et al., 2011].

В отличие от этого, некоторые исследования показали отсутствие ассоциации *5-HTTLPR* полиморфизма и ПТСР [Mellman et al., 2009; Sayin et al., 2010]. Такие результаты объясняются тем, что позже было установлено наличие третьего функционального аллеля ($L_A/L_G/S$) [Nakamura et al., 2000]. Таким образом, более ранние исследования ассоциации могут не отражать полный спектр генетической изменчивости [Kenna et al., 2012]. Также была обнаружена связь ПТСР и полиморфизма серотонинового рецептора 2A (rs6311), другого варианта серотонинергической системы [Lee et al., 2007; Mellman et al., 2009].

Гены-кандидаты дофаминергической системы.

Нарушение регуляции дофаминергической нейротрансмиссии также играет роль в патофизиологии ПТСР. В исследованиях на животных моделях, дофаминергическая иннервация базолатерального ядра амигдалы, медиальной префронтальной коры и других лимбических областей мозга показано высокая восприимчивость на стресс, и эти структуры могут быть изменены в результате стресса [Goldstein et al., 1996; Inglis & Moghaddam, 1999]. Кроме того, повышенная реакция на акустический раздражитель,

которая может быть симптомом ПТСР, была связана с агонистом дофаминового рецептора D1 у крыс [Meloni & Davis, 1999]. Генетические нарушения выделения дофамина и экспрессии дофаминового рецептора у мышей были связаны с поведенческими отклонениями, вызванными хроническим стрессом [Puglisi-Allegra & Cabib, 1997]. Исследования также показали, что существует связь между уровнем дофамина в крови человека и тяжестью симптомов ПТСР [Yehuda et al., 1992; Hamner & Diamond, 1993; Segman et al., 2002; Drury et al., 2009; Valente et al., 2011; Chang et al., 2012].

Гены-кандидаты гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси.

ПТСР характеризуется также нарушением регуляции систем ответа на стресс, например, таких как ГГН ось [Yehuda et al., 1993; Yehuda, 2009; Yehuda, 2011]. Эффекты нарушения деятельности ГГН оси возникают, в частности, за счет подавления выброса кортизола, который происходит по механизму обратной связи опосредованной повышением чувствительности глюкокортикоидного рецептора (GR) [van Zuiden et al., 2013]. Некоторые исследования показали связь между ПТСР и генетическими вариациями каннабиноидных рецепторов (*CNR1*) [Lu et al., 2008], а также между однонуклеотидным полиморфизмом гена рецептора КРГ (*CRHR1*, rs12944712) [Amstadter et al., 2011]. Однако, никаких ассоциаций не было найдено между полиморфизмами гена глюкокортикоидного рецептора (*NR3C1*) и ПТСР [Bachmann et al., 2005]. Некоторые исследования подтверждают, что те лица, которые имеют однонуклеотидный полиморфизм гена *FKBP5*, кодирующего FK506 связывающий белок-5, более подвержены развитию ПТСР [Binder et al., 2008; Xie et al., 2010; White et al., 2012; Fani et al., 2013]. Таким образом, нейробиология регуляции стресса, особенно в отношении ГГН оси и регулирования продукции КРГ и кортизола, может лежать в основе многих симптомов ПТСР.

Гены-кандидаты нейротрофического фактора мозга (BDNF).

Нейротрофический фактор мозга (BDNF), член семьи нейротрофинов, способствует выживаемости нейронов и регулирует пролиферацию и дифференцировку нервных клеток периферической и центральной нервной систем. Он участвует в нейронной пластичности, лежащей в основе ответа на страх и восстановление от стресса, которые нарушены при ПТСР [Chhatwal et al., 2006; Heldt et al., 2007; Soliman et al., 2010;

Andero & Ressler, 2012]. Существуют убедительные доказательства, что BDNF может участвовать в патогенезе ряда нервно-психических расстройств и также, полагают, участвует в патогенезе ПТСР.

Дополнительные гены-кандидаты.

Некоторые исследования подтверждают связь между геном нейропептида Y (*NPY*) и ПТСР [Sah and Geracioti, 2013]. *NPY* был выявлен как фактор риска для тревожных расстройств [Kaabi et al., 2006], и считается, что он играет непосредственную роль в ослаблении состояния страха [Gutman et al., 2008].

Известно, что ГАМК играет определенную роль в патогенезе тревожных, аффективных расстройств и бессонницы, явлений, которые также появляются при ПТСР. Однако очень мало известно о связи ГАМК системы и ПТСР [Broekman et al., 2007; Paydar et al., 2014].

Аполипопротеин Е (АРОЕ) обеспечивает связывание липопротеидов липопротеинами низкой плотности (ЛНП) и играет важную роль в метаболизме липопротеинов и холестерина [Mahley, 1988]. У человека АРОЕ4 изоформа связана с рядом нервно-психических расстройств, в том числе болезнью Альцгеймера, стресса и депрессии, а также с уменьшением объема гиппокампа и нарушением памяти [Flory et al., 2000; Cohen et al., 2001; Gallagher-Thompson et al., 2001; Broekman et al., 2007; Almlit et al., 2014]. Некоторые исследования подтверждают достоверную связь между АРОЕ2 изоформой и ПТСР [Freeman et al., 2005]. Тем не менее по-прежнему недостаточно доказательств о возможной роли генотипа АРОЕ при ПТСР.

Несмотря на увеличение числа исследований по молекулярной генетике ПТСР в течение многих лет, все еще очень мало известно о генетической предрасположенности ПТСР [Amstadter et al., 2012]. Сегодня не вызывает сомнения то, что ПТСР является сложным, полигенным нарушением [Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee, 2009].

Таблица 1.3. Связанные с ПТСР возможные гены и их локализация.

Ген	Название гена	Хромосома	Результат	Автор
Гены-кандидаты серотонинергической система				
<i>SLC6A4 (HTT, 5HTT, SERT, 5-HTTLPR)</i>	Транспортер серотонина	17q11.1-q12	положительная ассоциация между SS генотипом и ПТСР	Lee et al. , 2005; Thakur et al. , 2009; Mellman et al. , 2009; Sayin et al. , 2010; Kolassa et al. , 2010a
<i>HTR2 (5-HT2A)</i>	Рецептор 5-гидрокситриптамин (серотонин) 2A	13q14-q21	связь между промотрным участком <i>5HT2A</i> и ПТСР	Mellman et al., 2009
Гены-кандидаты дофаминергической система				
<i>DRD2 (D2R, D2DR)</i>	дофаминовый рецептор D2	11q23	положительная ассоциация между A1 аллелем <i>DRD2</i> и ПТСР	Young et al. , 2002; Voisey et al. , 2009
<i>DRD3</i>	дофаминовый рецептор D3	3q13.3	ассоциация минорного аллеля с понижением риска ПТСР	Wolf et al. , 2014
<i>DRD4 (D4DR)</i>	дофаминовый рецептор D4	11p15.5	положительная ассоциация с симптомами ПТСР	Dragan et al. , 2009
<i>SLC6A3 (DAT1)</i>	транспортер дофамина	5p15.3	положительная ассоциация с ПТСР	Segman et al. , 2002; Drury et al. , 2013
<i>DBH</i>	дофамин-бета-гидроксилаза	9q34	<i>DBH</i> -1021C / T ассоциируется с уровнем <i>DBH</i> плазмы; отсутствие ассоциации с ПТСР	Mustapic et al. , 2007

Таблица 1.3. (продолжение)

Ген	Название гена	Хромосома	Результат	Автор
Гены-кандидаты гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси.				
<i>FKBP5</i>	FK506 связывающий белок 5	6p21	положительная ассоциация носительства минорного аллеля и возникновения ПТСР	Binder et al. , 2008; Xie et al. , 2010
<i>CNR1 (CB1, CNR)</i>	каннабиоидный рецептор 1	6q14-q15	положительная ассоциация с ПТСР	Lu et al. , 2008
<i>GCCR (NR3C1)</i>	глюкокортикоидный рецептор	5q31.3	отсутствие ассоциации с ПТСР	Bachmann et al. , 2005
Гены-кандидаты нейротрофического фактора мозга (BDNF)				
<i>BDNF</i>	нейротрофический фактор	11p13	отсутствие ассоциации между <i>BDNF</i> G-712 A, C270 T и Val66Met и	Zhang et al. , 2006; Lee et al. , 2006
Дополнительные гены-кандидаты				
<i>NPY</i>	нейропептид Y	7p15.1	отсутствие ассоциации между <i>NPY</i> pro7/leu7 и leu7/leu7 и ПТСР	Lappalainen et al. , 2002
<i>GABR3</i>	GABA (A) рецептор β 3	15q11-13	положительная ассоциация между <i>GABR3</i> и тяжестью симптомов ПТСР	Feusner et al., 2001
<i>COMT</i>	катехол- <i>O</i> -метилтрансфераза	22q11	GxE взаимодействие между <i>COMT</i> Val158Met полиморфизмом и ПТСР	Kolassa et al. , 2010b
<i>APOE</i>	аполипопротеин E	19q13	Ассоциация между APOE2 и ухудшением памяти + более тяжелые симптомы переживания	Freeman et al. , 2005

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнена в лаборатории геномики и иммуномики имени проф. А.С. Бояджян Института молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения (НАН РА) и в отделе патологической физиологии факультета медицины и стоматологии университета Палацкого (Оломоуц, Чехия).

2.1. СУБЪЕКТЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Субъектами исследования являлись:

- больные ПТСР
- психически и физически здоровые лица (ЗЛ), вошедшие в контрольную группу, которую добровольно составили научные сотрудники ИМБ НАН РА и другие добровольцы.

Диагностика больных проводилась психиатрами отделения реабилитации психического здоровья «Стресс» Медицинского реабилитационного центра "АртМед" МЗ РА в соответствии с клиническими выражениями, для чего использовались структурное клиническое диагностическое интервью в соответствии с диагностическим и статистическим руководством по психическим заболеваниям DSM-IV-TR (SCID-I) [Spitzer et al., 1994], клиническая диагностическая шкала (Clinical-administered PTSD Scale; CAPS) [Blake et al., 1995], а также Миссисипская шкала для оценки посттравматических реакций. ЗЛ в прошлом и во время исследований не имели психических травм или стресса, для оценки чего так же использовалось структурное клиническое диагностическое интервью в соответствии с диагностическим и статистическим руководством по психическим заболеваниям (DSM-IV; SCID-I).

Все субъекты, вовлеченные в данное исследование, были этническими армянами, не состоявшими в родственных связях друг с другом, проживающими на территории Республики Армения и Арцах. Среди субъектов исследования никто не болел острыми или хроническими инфекционными, аутовоспалительными, аутоиммунными, церебрально-сосудистыми, сердечно-сосудистыми, эндокринными, метаболическими,

онкологическими, неврологическими или другими серьезными заболеваниями (не считая ПТСП в случае больных ПТСП) и не подвергался хирургическому вмешательству как минимум за год до взятия крови.

Все субъекты, вовлеченные в данную работу, дали свое согласие на взятие крови и были проинформированы, что их образцы крови и ДНК будут использоваться в научных целях, без какого-либо диагностического и терапевтического значения.

На проведение настоящего исследования было получено разрешение комитета по этике Института молекулярной биологии НАН РА (IRB #00004079).

В эксперименты по исследованию концентрации белков плазмы было вовлечено 40 больных ПТСП (средний возраст (годы, $M \pm \sigma$) 48 ± 7.6) и 40 ЗЛ (средний возраст (годы, $M \pm \sigma$) 46 ± 3). Как больные ПТСП, так и здоровые были мужского пола.

В эксперименты по генотипированию полиморфизмов (см. ниже) было вовлечено 200 больных ПТСП (средний возраст (годы, $M \pm \sigma$) 44.2 ± 9.8 ; средняя длительность заболевания (годы, $M \pm \sigma$) 20 ± 3.8) и 200 ЗЛ (средний возраст (годы, $M \pm \sigma$) 42.6 ± 9.2). Как больные ПТСП, так и здоровые были мужского пола.

Объектами исследования являлись образцы плазмы крови и геномной ДНК лейкоцитов периферической крови больных ПТСП и ЗЛ, которые были собраны в течение 2011-2015 гг.

2.2. ПОЛУЧЕНИЕ ИССЛЕДУЕМЫХ ОБРАЗЦОВ

Образцы крови были получены из локтевой вены утром натощак. Кровь брали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта 1.2-2.0 мг K_2EDTA . Образцы цельной крови центрифугировали при 3000 g в течение 10 минут и отбирали плазму, а остальную часть использовали для получения геномной ДНК.

Образцы плазмы и ДНК хранили при температуре $-30^\circ C$ и были разморожены непосредственно перед использованием.

2.2.1. Получение образцов геномной ДНК из периферической крови

Процедуру выделения ДНК из образцов крови больных ПТСП и ЗЛ проводили по модификации ранее описанного метода высаливания по Миллеру [Miller et al., 1988], где фаза протеиназы К была замещена фазой экстракции хлороформом [Welsh & Bunce, 1999]. Этот метод позволяет получить большое количество качественной ДНК, пригодной для метода полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (PCR-SSP). К 5 мл цельной крови добавляли до 45 мл буферного раствора, содержащего 0.144 М NH_4Cl и 1 мМ NaHCO_3 . Смесь тщательно перемешивали, инкубировали 5 мин при 4°C, после чего центрифугировали при 3000g в течение 10 мин при той же температуре. Надосадочную жидкость сливали, осадок суспендировали в 10 мл того же буфера и смесь центрифугировали как было описано выше. После центрифугирования надосадочную жидкость сливали, осадок ресуспендировали в 3 мл лизисного буферного раствора, содержащего 10 мМ Tris-HCl, 0.4 М NaCl, 2 мМ Na_2EDTA , который доводили до pH 8,0 добавлением 1М раствора NaOH, и 10% вес/объем SDS. К смеси добавляли 1 мл 6М NaCl и 2 мл хлорформа и тщательно перемешивали до образования гомогенного раствора молочно-белого цвета и центрифугировали при 3000g в течение 10 мин. Затем с помощью пипетки надосадочную жидкость переносили в новую пробирку и к ней добавляли 2 объема 95% этанола. Смесь слегка взбалтывали плавными круговыми движениями до полного высаживания ДНК на границе раздела фаз, после чего извлекали ее из смеси стеклянной палочкой. Изолированную ДНК дважды промывали 70% охлажденным этанолом, суспендировали в 0.3 мл 0.01 М Tris-HCl буфера, pH 8.0, содержащего 1 мМ EDTA, и оставляли на ночь при 4°C до полного растворения ДНК.

2.2.2. Определение концентрации ДНК в полученных образцах

Для определения концентрации и степени чистоты ДНК в полученных образцах измеряли оптическую плотность в ультрафиолетовой (УФ) области спектра при длине волны 260 нм (A_{260}), соответствующей максимуму оптического поглощения нуклеиновых кислот. Измерения проводили используя «Micro Spectrophotometer Nano-200»

спектрофотометр и рассчитывали концентрацию ДНК в образцах, основываясь на том, что для двухспиральной ДНК $A_{260}=1$ соответствует концентрации 50 мкг/мл. Согласно полученным данным, выход ДНК из 5 мл цельной крови в среднем составлял 0.12 мг. При генотипировании использовали 0.03 мкг каждого образца ДНК.

2.2.3. Оценка целостности и чистоты полученных образцов ДНК

Анализ целостности образцов ДНК проводили с помощью электрофореза (ЭФ) в 2% агарозном геле при условиях, описанных ниже в подглаве 2.3.3. “Проведение ЭФ исходных образцов и продуктов амплификации ДНК”. Целостность каждого образца анализировали путем визуального сопоставления электрофореграмм исследуемых образцов и стандартов олигонуклеотидов известной длины, основанные на отсутствии фрагментов ДНК. В исследованиях были использованы образцы ДНК, обладающие максимальной степенью целостности.

Чистоту выделенных ДНК определяли спектрофотометрическим методом. Измеряли поглощение в УФ-области оптического спектра при длинах волн 230, 260 и 280 нм (A_{230} , A_{260} и A_{280} , соответственно). Чистоту образцов определи исходя из соотношения A_{260}/A_{280} и A_{260}/A_{230} . Соотношение A_{260}/A_{280} (должно быть порядка 1.8) определяли с целью выявления загрязнения образцов ДНК белками, для последних максимальное оптическое поглощение характерно при длине волны 280 нм. Для оценки наличия в образцах ДНК углеводов, ароматических соединений и пептидов определяли соотношения A_{260}/A_{230} (должно быть в пределах 2 – 2.2), для последних максимальное оптическое поглощение характерно при длине волны 230 нм. В исследования были включены образцы ДНК обладающие высокой степенью чистоты.

2.3. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ДНК

2.3.1. Выбор однонуклеотидных полиморфизмов исследуемых генов *BCL2*, *BAX*, *ANXA5*, *ANXA11*, *CPLX2*, *BDNF*, *NTNG1*, *NGF*, *NGFR*, *CHN1*, *FOS*, *JUN*, *IER5*, *TERC* и *TERT* для генотипирования

Генотипирование образцов ДНК проводили в дубликатах. С целью проверки воспроизводимости экспериментальных данных для 10% произвольно выбранных образцов исследования проводили дважды. Полученные результаты практически полностью соответствовали повторам и наблюдалась практически полная воспроизводимость данных.

Таблица 2.1. Краткая характеристика исследуемых генов и их однонуклеотидных полиморфизмов, выбранных на основе вышеотмеченных критериев.

Ген			SNP			
Название	ID*	Локализация	ID	Нукл./амк. замена	Позиция	Локализация (тип мутации)
<i>BCL2</i>	596	18q21.33	rs956572	G>A	60820571	интрон
			rs1801018	A>G	60985879	экзон (синонимная)
<i>BAX</i>	581	19q13.33	rs1057369	A>G	49464866	интрон
<i>ANXA5</i>	308	4q27	rs11575945	-1C>T	122617745	Козак последовательность
<i>ANXA11</i>	311	10q21-23	rs1049550	G>A Arg230Cys	81916682	экзон (миссенс)
<i>CPLX2</i>	10814	5q35.2	rs1366116	C>T	175297531	интрон
			rs3892909	C>T	175305591	интрон
<i>NTNG1</i>	22854	1p13.3	rs628117	A>G	107997106	интрон
<i>BDNF</i>	627	11p13	rs6265	G>A Val66Met	27679916	экзон (миссенс)
<i>NGF</i>	4803	1p13.1	rs6330	G>A Ala35Val	115829313	экзон (миссенс)
			rs4839435	G>A	115858104	интрон

Таблица 2.1. (продолжение)

Ген			SNP			
Название	ID*	Локализация	ID	Нукл./амк. замена	Позиция	Локализация (тип мутации)
<i>NGFR</i>	4804	17q21-q22	rs11466155	C>T	44942998	ЭКЗОН (синонимная)
			rs734194	T>G	47591609	3'-UTR
<i>CHN1</i>	1123	2q31.1	rs14228	C>T	175711942	интрон, 5'- UTR
			rs2646153	A>G	175666656	интрон
<i>FOS</i>	2353	14q24.3	rs7101	C>T	75745626	5'- UTR
			rs1063169	G>T	75747118	интрон
<i>JUN</i>	3725	1p32.1	rs11688	G>A	59247993	ЭКЗОН (синонимная)
<i>IER5</i>	51278	1q25.3	rs6425663	G>T	181057874	5'- UTR
<i>TERC</i>	7012	3q26.2	rs12696304	C>G	169763483	downstream область
<i>TERT</i>	7015	5p15.33	rs7726159	G>T	1282204	интрон
			rs2736100	G>T	1286401	интрон

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

Выбор однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) исследуемых генов для последующего изучения их ассоциации с ПТСР проводили при использовании баз данных и геномных браузеров Национального центра биотехнологической информации США (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) и международного проекта HapMap [International Haplotype Map Project; <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>]. Выбор был основан на функциональной значимости полиморфизмов, частоте встречаемости минорного аллеля и результатах «tagging»-анализа. В итоге были выбраны следующие SNP исследуемых генов: *BCL2* rs956572, rs1801018; *BAX* rs1057369; *ANXA5* rs11575945; *ANXA11* rs1049550; *CPLX2* rs1366116, rs3892909; *BDNF* rs6265; *NTNG1* rs628117; *NGF* rs6330, rs4839435; *NGFR* rs11466155, rs734194; *CHN1* rs14228, rs2646153;

FOS rs7101, rs1063169; *JUN* rs11688, *IER5* rs6425663; *TERC* rs12696304; *TERT* rs7726159 и rs2736100. В таблице 2.1 представлена краткая характеристика выбранных полиморфизмов.

2.3.2. Анализ выбранных полиморфизмов исследуемых генов методом полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (PCR-SSP)

Анализ выбранных полиморфизмов исследуемых генов, включая *BCL2* rs956572, rs1801018; *BAX* rs1057369; *ANXA5* rs11575945; *ANXA11* rs1049550; *CPLX2* rs1366116, rs3892909; *BDNF* rs6265; *NTNG1* rs628117; *NGF* rs6330, rs4839435; *NGFR* rs11466155, rs734194; *CHN1* rs14228, rs2646153; *FOS* rs7101, rs1063169; *JUN* rs11688; *IER5* rs6425663; *TERC* rs12696304; *TERT* rs7726159 и rs2736100 проводили при использовании PCR-SSP [Bunce et al., 1995].

Метод основан на избирательной амплификации определенного участка геномной ДНК, включающего интересующую нуклеотидную последовательность исследуемого гена, с помощью фермента Таq-ДНК-полимеразы. Также необходимо наличие двух праймеров – аллель-специфичных олигонуклеотидов, которые отличаются лишь одним нуклеотидным основанием. Каждый из праймеров содержит 3'-концевой нуклеотид, комплементарный, соответственно, нуклеотиду стандартного и минорного аллелям. Помимо аллель-специфичных праймеров, необходимо также наличие нуклеотидной последовательности (константный праймер), комплементарной амплифицируемому участку с 3'-конца матрицы (константному участку ДНК). Наличие пар праймеров необходимо для ограничения начала и конца амплифицируемого участка. Для правильной интерпретации результатов генотипирования использовали также пару контрольных праймеров, которые выполняют роль положительного контроля (образец заведомо содержит последовательность-мишень). Наличие контрольных праймеров исключает ложноотрицательные результаты, так как при отсутствии синтеза контрольного ампликона можно судить о наличии ингибиторов PCR в исследуемом образце. Дизайн праймеров для генотипирования методом PCR-SSP проводился, используя базы данных последовательностей нуклеотидов «GenBank» (nucleotide sequence database;

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Национального центра биотехнологической информации США [www.ncbi.nlm.nih.gov].

Нуклеотидные последовательности праймеров, полученные в результате дизайна, для генотипирования приведены в таблице 2.2. Реакционная смесь для проведения амплификации содержала по 0.3 мкл аллель-специфичных праймеров и столько же константного праймера (100 пмоль в 1 мл воды), 5 мкл 0.01 М Tris-HCl буфера (pH 8.5), по 0.03 мкл (100 пмоль в 1 мл воды) каждого из двух контрольных праймеров (положительный контроль), 0.5 мкл исследуемых образцов (геномная ДНК), 0.14 мкл 0.02 М стандартной смеси из четырех dNTP (дезоксинуклеозидтрифосфат), 1.1 мкл 0.025 М MgCl₂, 1.37 мкл 0.67 М Tris-HCl буфера (содержащего 0.166 М (NH₄)₂SO₄ и 1% Twin 20 (pH 8.8)), 0.07 мкл Taq-полимеразы (1 единица/мл) и 5.68 мкл воды.

Таблица 2.2. Праймеры, использованные при генотипировании образцов ДНК по выбранным SNP исследуемых генов методом PCR-SSP.

Ген	SNP ID	Тип и нуклеотидная последовательность (5' → 3') праймера
<i>BCL2</i>	rs956572	стандартный: AGAGGGAGTCATGACTGAATC минорный: AGAGGGAGTCATGACTGAATT константный: CAGATCTGTGCTTGAACCTCA
	rs1801018	стандартный: ATCTCCCGGTTATCGTACCCT минорный: ATCTCCCGGTTATCGTACCCC константный: GATCCGAAAGGAATTGGAATA
<i>BAX</i>	rs1057369	стандартный: ATCTTCTTCCAGATGGTGAGT минорный: ATCTTCTTCCAGATGGTGAGC константный: TTACAGGTGTGAGCCACCATG
<i>ANXA5</i>	rs11575945	стандартный: CCTGACCTGAGTAGTCGC минорный: CCTGACCTGAGTAGTCGCT константный: GCCACGTCACCAGCTGTTGC
<i>BCL2</i>	rs956572	стандартный: AGAGGGAGTCATGACTGAATC минорный: AGAGGGAGTCATGACTGAATT константный: CAGATCTGTGCTTGAACCTCA
	rs1801018	стандартный: ATCTCCCGGTTATCGTACCCT минорный: ATCTCCCGGTTATCGTACCCC константный: GATCCGAAAGGAATTGGAATA

Таблица 2.2. (продолжение)

Ген	SNP ID	Тип и нуклеотидная последовательность (5' → 3') праймера
<i>BAX</i>	rs1057369	стандартный: АТСТТСТТССАГАТGGTGAGT минорный: АТСТТСТТССАГАТGGTGAGC константный: ТТАСАГГТGTGAGCCACCATG
<i>ANXA5</i>	rs11575945	стандартный: CCTGACCTGAGTAGTCGC минорный: CCTGACCTGAGTAGTCGCT константный: GCCACGTCACCAGCTGTTGC
<i>ANXA11</i>	rs1049550	стандартный: CTGCCGCTGCTTGTGGAGCG минорный: CTGCCGCTGCTTGTGGAGCA константный: САССТССАГГАТGCCCTCATAT
<i>CPLX2</i>	rs1366116	стандартный: АТGTGTAGGAAAATGGCTTCG минорный: АТGTGTAGGAAAATGGCTTCA константный: СААТGGCCTCTGACTGGTG
	rs3892909	стандартный: GGTGAGGCTGCTGTCTGC минорный: GGTGAGGCTGCTGTCTGT константный: СТGCTTCATGACGAAGTCCA
<i>BDNF</i>	rs6265	стандартный: GGCTGACACTTTCGAACACG минорный: GGCTGACACTTTCGAACACA константный: GTTACCCACTCACTAATACTG
<i>NTNG1</i>	rs628117	стандартный: АТCCTTGGAATGAAAGCCCA минорный: АТCCTTGGAATGAAAGCCCG константный: ТСАСТGCCCTCTGTGTGCAGTG
<i>NGF</i>	rs6330	стандартный: GACACACCATCCCCAAGC минорный: GACACACCATCCCCAAGT константный: АГГСТGGGTGCTAAACAGC
	rs4839435	стандартный: TGGGTGCCAAAAAGCTTGGC минорный: TGGGTGCCAAAAAGCTTGGT константный: GCAGCTCCTGCAATTATCCA
<i>NGFR</i>	rs11466155	стандартный: АГГСТАТGTAGGCCACAAGG минорный: TGGGTGCCAAAAAGCTTGGT константный: GCAGCTCCTGCAATTATCCA
	rs734194	стандартный: АГГСТАТGTAGGCCACAAGG минорный: АГГСТАТGTAGGCCACAAGA константный: САГАГГГСТCGGACAGCACA

Таблица 2.2. (продолжение)

Ген	SNP ID	Тип и нуклеотидная последовательность (5'→3') праймера
<i>CHN1</i>	rs14228	стандартный: СТААСАСАТГАСАТТСТГСС минорный: СТААСАСАТГАСАТТСТГСТ константный: ТТГАТГТТАСАТСГАСТСТТ
	rs2646153	стандартный: ААГСТГТГГАСААГГААТТАС минорный: ААГСТГТГГАСААГГААТТАТ константный: ТГССАТГАСГТАССГГАГ
<i>FOS</i>	rs7101	стандартный: СТССТАСССАГСТСТГСТС минорный: СТССТАСССАГСТСТГСТТ константный: ТТГАСАГГСГАССССАТГС
	rs1063169	стандартный: ТСТГАССТГСАГТТГСАГАС минорный: ТСТГАССТГСАГТТГСАГАА константный: ГСАСАТССГТААСТГГГАГ
<i>JUN</i>	rs11688	стандартный: ТССГССТТГАТСССГСТСС минорный: ТССГССТТГАТСССГСТСТ константный: ААСССАГГСГСГСТГАС
<i>IER5</i>	rs6425663	стандартный: ТГСТСТАСТААССТСТССАА минорный: ТГСТСТАСТААССТСТССАС константный: АССТГСТСССГСГГГАС
<i>TERC</i>	rs12696304	стандартный: АТС ТТА ГАТ САС СТТ ГАГ ТАА АС минорный: АТС ТТА ГАТ САС СТТ ГАГ ТАА АГ константный: ТГГ ААТ ТГТ СТА ГСА ГАТ АСА ТТ
<i>TERT</i>	rs7726159	стандартный: САГ ГАГ ТТТ ГТГ ССА АГТ ГГ минорный: САГ ГАГ ТТТ ГТГ ССА АГТ ГТ константный: ТГА ГГС ТГГ ТГА АТС ГСТ ТАА
	rs2736100	стандартный: ТТТ ССГ ТГТ ТГА ГТГ ТТТ СТГ минорный: ТТТ ССГ ТГТ ТГА ГТГ ТТТ СТТ константный: СТГ ТГС АТС АТА АСГ АГА ГГТ
		контрольный праймер 1: ТГССААГТГГАСАСССАА
		контрольный праймер 2: ГСАТСТТГСТСТГТГСАГАТ

PCR-SSP проводили на термоциклере «iCycler» по следующей четырехэтапной схеме (таблица 2.3). На первом этапе амплификации происходит предварительная денатурация двухспиральной ДНК, для чего реакционная смесь нагревалась до 96°C x 5 мин. На втором этапе происходит отжиг праймеров, при котором к одноцепочечной ДНК присоединяются праймеры и образуются короткие двухспиральные фрагменты на одноцепочечных ДНК, далее при участии Taq полимеразы достраиваются комплементарные цепи с 3'-концов праймеров (элонгация). В течение одного такого цикла образуются две идентичные копии выбранного участка двухспиральной ДНК. В результате 30 таких циклов происходит экспоненциальное увеличение количества ампликонов. На следующем этапе для полного завершения элонгации и деактивации Taq полимеразы, смесь инкубировали при 72°C x 7 мин. На последнем этапе происходит охлаждение реакционной смеси и сбор ампликонов (4°C x 1 мин).

Таблица 2.3. Условия проведения PCR-SSP.

Число циклов	Стадия	Температура, °C	Продолжительность
Цикл 1 (1x)	Стадия 1	96	5 мин
Цикл 2 (30x)	Стадия 1	96	30 сек
	Стадия 2	65	30 сек
	Стадия 3	72	1 мин
Цикл 3 (1x)	Стадия 1	72	7 мин
Цикл 4 (1x)	Стадия 1	4	∞

2.3.3. Проведение электрофореза

Электрофорез исходных образцов и продуктов амплификации ДНК проводили в 2% агарозном геле (0.045 М Tris-боратный буфер, pH 8.0, содержащий 0.001 М EDTA и 10 мг/мл этидиум бромид (флуоресцентный краситель)), при использовании горизонтального электрофореза на полистироловых пластинах (12 x 10 см) при толщине геля 5 мм при комнатной температуре. Перед внесением в лунку геля 10 мкл анализируемые образцы

ДНК смешивали с 5 мкл буфера для нанесения (loading buffer, 0.18 М Tris-боратного буфера, pH 8.0, содержащего 0.004 М EDTA, 0.03% глицерин и 0.25% бромфеноловый синий). Низкомолекулярный кислый краситель, мигрирующий в том же направлении, в буфере облегчает внесение образцов и позволяет следить за ходом электрофореза. В одну из лунок геля вносили ДНК маркер, содержащий смесь фрагментов ДНК известной молекулярной массы (100 – 1000 п.н.). Электрофорез проводили при комнатной температуре в камере, заполненной 0.045 М Tris-боратным буфером, pH 8.0, содержащим 0.001 М EDTA, при постоянном напряжении на электродах 130 вольт в течение 15 мин. Верхний полюс – катод. По окончании электрофореза ДНК в агарозном геле визуализировали с помощью системы гель-документирования.

2.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОЙ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В ЛЕЙКОЦИТАХ

Анализ относительной длины теломер в лейкоцитах (оДТЛ) проводили при использовании монохромного мультиплексного количественного PCR (MMqPCR) [Cawthon, 2009]. Метод заключался в определении коэффициента, основанного на соотношении числа копий повторов теломер и гена представленного одной копией в геноме (single copy gene (scg)), между образцами ДНК и стандартной ДНК. Это соотношение пропорционально средней длине теломер. Для каждого экспериментального образца оДТЛ рассчитывали как соотношение (T / S), где (T) – число копий повторов теломер, а (S) – число копий гена представленного одной копией в геноме. Это отношение измеряется относительно стандартной ДНК, которая в данном случае была представлена смесью образцов ДНК нескольких здоровых контролей.

При измерении оДТЛ использовали следующие праймеры (5' → 3') (Integrated DNA Technologies Inc., США): telg (900 нМ): ACACTAAGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTAGTGT и telc (900 нМ): TGTTAGGTATCCSTATCCSTATCCSTATCCSTATCCСТААСА. Прогнозируемый размер продукта составлял 76 п.н. Праймерами для амплификации бета-глобина (scg) были hbgu (500 нМ): CGGCGGCGGGCGGCGGGCTGGGCGGCTTCATCCACGTTACCTTG и

hbgd (500 нм): GCCCGGCCCGCCGCGCCCGTCCCGCCGGAGGAGAAGTCTGCCGTT.

Прогнозируемый размер продукта составляет 106 п.н.

Конечный объем реакционной смеси составлял 10 мкл и содержал 5 мкл 5×*Power SYBR™ Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems Inc., США), 1 мкл ДНК (около 20 нг), 0.2 мкл соответствующих праймеров и 3.2 мкл воды. Реакционную смесь далее помещали в термоциклер «Realist DX – IAB» для проведения ММqPCR по схеме, приведенной в таблице 2.4.

Таблица 2.4. Условия проведения ММqPCR.

Число циклов	Стадия	Температура, °С	Продолжительность
Цикл 1 (1x)	Стадия 1	95	15 мин
Цикл 2 (2x)	Стадия 1	94	15 сек
	Стадия 2	49	60 сек
Цикл 3 (4x)	Стадия 1	94	15 сек
	Стадия 2	59	30 сек
Цикл 4 (20x)	Стадия 1	85	15 сек
	Стадия 2	59	30 сек*
Цикл 5 (27x)	Стадия 1	94	15 сек
	Стадия 2	84	10 сек
	Стадия 3	85	15 сек*

*регистрация флуоресцентного сигнала

Накопление специфического продукта амплификации регистрировали путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. После завершения термоциклирования данные анализировали, используя программное обеспечение прибора. Средние значения C_t , т.е. число цикла, при котором накапливаемая флуоресценция пересекает порог, что представляет собой превышение базовой флуоресценции на несколько стандартных отклонений, для обоих генов были использованы для расчета относительного соотношения T / S для каждого экспериментального образца. Относительное отношение T / S (T / S одного образца относительно T / S другого образца)

определяли по методу $\Delta\Delta C_t$, используя формулу $T / S = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, где $\Delta\Delta C_t = (C_{t_{\text{теломер}}} - C_{t_{\text{глобин}}})$ образца - $(C_{t_{\text{теломер}}} - C_{t_{\text{глобин}}})$ референтной ДНК.

2.5. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

Концентрацию белков Vcl-2, Вах, ANXA5 и CPLX2 в плазме крови определяли методом ИФА при использовании коммерческого набора реагентов, согласно инструкции производителя. Набор предназначен для *in vitro* количественного определения исследуемых белков в сыворотке или плазме человека, культуральных средах и других биологических жидкостях и основан на твердофазном «сендвич»-варианте ИФА.

2.5.1. Определение уровня белка Vcl-2

Концентрацию Vcl-2 определяли используя Human B-cell Leukemia/Lymphoma 2 (BCL2) ИФА набора. Диапазон обнаружения метода составлял 1.56 – 100 нг/мл. Предел обнаружения минимального количества белка составлял менее 0.64 нг/мл.

В лунки микропланшета, покрытые антителами к Vcl-2, вносили по 100 мкл заранее разведенные стандарты, бланк и исследуемые образцы плазмы. Планшет плотно прикрывали пленкой и инкубировали 2 ч при температуре 37°C. По окончании инкубации пленку снимали, содержимое лунок сливали, не промывая добавляли 100 мкл рабочего раствора Реагента А. Планшет плотно прикрывали пленкой и инкубировали 1 ч при температуре 37°C, после чего пленку снимали, содержимое лунок сливали, а лунки трехкратно промывали промывочным буфером, добавляя каждый раз не менее 350 мкл раствора на лунку. Далее в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл рабочего раствора Реагента Б, планшет плотно прикрывали пленкой и инкубировали 30 мин при температуре 37°C. По окончании инкубации пленку снимали, содержимое лунок сливали, а лунки пятикратно промывали вышеотмеченным методом. Далее в каждую лунку планшета добавляли 90 мкл раствора Субстрата, планшет плотно прикрывали пленкой и инкубировали 15-25 мин в темноте при температуре 37°C. По окончании инкубации пленку снимали, реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл Стоп

раствора, вследствие чего раствор окрашивался в желтый цвет (максимум оптического поглощения в видимой области спектра составляет 450 нм). Далее на микропланшетном спектрофотометре измеряли оптическую плотность в видимой области спектра при длине волны 450 нм, пропорциональную концентрации Vcl-2. Содержание Vcl-2 в исследуемых образцах рассчитывали на основе калибровочной кривой, построенной при использовании стандартных растворов Vcl-2 в концентрациях 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25, 50 и 100 нг/мл. Стандарты получали серийным разведением раствора Vcl-2 известной концентрации раствором для разведения стандарта. Концентрацию Vcl-2 выражали в нг на мл плазмы.

2.5.2. Определение уровня белка Вах

Концентрацию Вах определяли используя Human Vcl-2 Associated X Protein (Вах) ИФА набора. Диапазон обнаружения метода составлял 0.78 – 50 нг/мл. Предел обнаружения минимального количества белка составлял менее 0.32 нг/мл.

Определение уровня белка Вах проводили по методу описанному в подглаве 2.5.1. Содержание Вах в исследуемых образцах рассчитывали на основе калибровочной кривой, построенной при использовании стандартных растворов Вах в концентрациях 0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.5, 25 и 50 нг/мл. Стандарты получали серийным разведением раствора Вах известной концентрации раствором для разведения стандарта. Концентрацию Вах выражали в нг на мл плазмы.

2.5.3. Определение уровня белка аннексина-А5

Концентрацию аннексина-А5 определяли используя Human Annexin A5 (ANXA5) ИФА набора. Диапазон обнаружения метода составлял 31.2 – 2000 пг/мл. Предел обнаружения минимального количества белка составлял менее 13.1 пг/мл.

Определение уровня белка аннексина-А5 проводили по методу описанному в подглаве 2.5.1. Содержание аннексина-А5 в исследуемых образцах рассчитывали на основе калибровочной кривой, построенной при использовании стандартных растворов аннексина-А5 в концентрациях 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 и 20 нг/мл. Стандарты

получали серийным разведением раствора аннексина-A5 известной концентрации раствором для разведения стандарта. Концентрацию аннексина-A5 выражали в нг на мл плазмы.

2.5.4. Определение уровня белка комплексина 2

Концентрацию комплексина 2 определяли используя Human Complexin 2 (CPLX2) ИФА набора. Диапазон обнаружения метода составлял 246.9 – 20000 пг/мл. Предел обнаружения минимального количества белка составлял менее 84.2 пг/мл.

Определение уровня белка комплексина 2 проводили по методу описанному в подглаве 2.5.1. Содержание комплексина 2 в исследуемых образцах рассчитывали на основе калибровочной кривой, построенной при использовании стандартных растворов комплексина 2 в концентрациях 246.9, 740.7, 2222.2, 6666.7 и 20000 пг/мл. Стандарты получали серийным разведением раствора комплексина 2 известной концентрации раствором для разведения стандарта. Концентрацию комплексина 2 выражали в пг на мл плазмы.

2.6. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Обработку полученных данных проводили с использованием программных пакетов «Graphpad Prism 6» (GraphPad Software Inc., США), «SPSS 21» (IBM Corporation, США). Данные, полученные при изучении уровней белков в плазме крови, проверяли на нормальность распределения при использовании W-критерия Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данных их анализировали методами параметрической статистики (непарный t-тест Стьюдента и корреляционный анализ Пирсона), а в случае отклонения данных от нормального распределения – методами непараметрической статистики (U-тест Манна-Уитни и корреляционный анализ Спирмена). При проведении корреляционного анализа рассчитывали коэффициент корреляции (R). Значения $p < 0.05$ были приняты как статистически значимые. Распределение генотипов в исследуемых группах при анализе данных генотипирования проверяли на соответствие закону Харди-

Вайнберга (закон генетического равновесия), который гласит, что в пределах генофонда популяции доля генотипов, содержащих разные аллели одного гена, из поколения в поколение остается неизменной [Salanti et al., 2005]. Частоту встречаемости генотипов, аллелей и носителей минорных аллелей в исследуемых группах рассчитывали на основании данных ЭФ. Достоверность различий по отмеченным параметрам между больными ПТСП и ЗЛ определяли по χ^2 -критерию Пирсона, рассчитывая отношение шансов (OR), 95%-й доверительный интервал (95% CI) и доверительную вероятность Пирсона (p). Значения $p < 0.05$ принимали как статистически значимые. Значения p , скорректированные с помощью поправки множественного сравнения Бонферрони, обозначали как $p_{\text{corrected}}$, а значения, не скорректированные – как p_{nominal} . Анализ и аннотацию исследуемых геномных вариаций проводили с использованием набора инструментов Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) [McLaren et al., 2016]. Дифференциальный анализ генов общедоступных наборов данных был проведен с использованием программного пакета «R 3.5.1» (R Foundation for Statistical Computing, Австрия).

2.7. ПРИБОРЫ

В работе использовали 96-луночный термоциклер для PCR-SSP «iCycler» фирмы Bio-Rad Laboratories Inc. (США) для амплификации продуктов генотипирования ДНК по выбранным полиморфизмам исследуемых генов, а ЭФ проводили на аппаратуре «Wide Mini-Sub Cell GT» фирмы Bio-Rad Laboratories Inc. (США), используя пластины размером 100x150x5 мм. Визуализацию флуоресцирующих комплексов бромистого этидиума с ДНК в геле по окончании ЭФ проводили с помощью системы гель документирования «Gel documentation system Gerix 1020TP» фирмы Biostep GmbH (Германия) при средней длине волны излучения 312 нм. Относительную длину теломер измеряли на приборе «Realist DX – IAB» фирмы GeneTiCA Kft. (Венгрия). Спектрофотометрические измерения проводили на приборах «Micro Spectrophotometer Nano-200» фирмы Hangzhou Allsheng Instruments Co., Ltd. (Allsheng) (Китай) и «Microplate Reader» фирмы Awareness Technology Inc. (США). В ходе экспериментов были использованы лабораторные настольные центрифуги «MPW-310» фирмы Mechanika (Польша), «LMC-3000» и центрифуга с охлаждением

«LMC-4200R» фирмы Biosan (Латвия), термошейкер для микропланшетов: «PST-60HL» и термошейкер «TS-100» фирмы Biosan (Латвия). Определение pH растворов проводили на pH-метре «MP 220» фирмы Mettler Toledo (Швейцария). Деионизированную воду получали, используя деионизатор «Destillo 2» фирмы Carl Roth GmbH (Германия).

2.8. РЕАКТИВЫ

В процессе экспериментов были использованы додецилсульфат натрия фирмы Digene Diagnostics (США), трис-HCl фирмы Fisher Scientific (Великобритания), твин 20 и бромистый этидий фирмы Ferak (Германия), бромфеноловый синий фирмы Serva (США), фосфатно-солевой буфер (PBS) фирмы Oxoid Ltd. (Англия), стандартная смесь дуплексных фрагментов ДНК известной длины (DNA-Ladder combi; число фрагментов - 20, пределы размеров – 100 – 1000 п.н.), агароза для ЭФ со значением коэффициента электроэрозийной обработки $<0,12$ фирмы Carl Roth GmbH (Германия), хлорид аммония (NH_4Cl) фирмы Mallinckrodt (США), соляная кислота (HCl), хлорид натрия (NaCl), хлорид калия (KCl), гидрокарбонат калия (KHCO_3) натрий уксуснокислый (CH_3COONa), EDTA (этилендиаминтетраацетат; динатриевая соль) фирмы Sigma-Aldrich Co. (США). При клонировании исследуемых генов использовали смесь «заякоренных олиго (dT) праймеров» (anchored oligo (dT) primers) фирмы ABgene Ltd. (США). При проведении PCR-SSP использовали ДНК полимеразу (Taq polymerase) фирмы Sybexzyme (РФ), аллель-специфичные праймеры для PCR-SSP фирмы Eurofins Scientific GmbH (Германия) и Integrated DNA Technologies Inc. (США), а также стандартную смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов («dNTPs») фирмы Sybenzyme (РФ). При ИФА анализе использовали следующие коммерческие наборы реагентов: Human B-cell Leukemia/Lymphoma 2 (BCL2), #SEA778Hu; Human Bcl-2 Associated X Protein (Bax), #SEB343Hu; Human Annexin A5 (ANXA5), #SEA259Hu; Human Complexin 2 (CPLX2), #CEF332Hu фирмы Usen Life Science Inc. (КНР).

Все растворы готовили на деионизированной воде.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. МАРКЕРЫ АПОПТОЗА ПРИ ПТСР

Большинство важных явлений, вызывающих апоптоз, происходящих в митохондриях, связаны с нарушением внутреннего трансмембранного потенциала митохондрий, что приводит к разрыву митохондриальной мембраны и высвобождению цитохрома С и, следовательно, активации каспазного каскада, а также про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 [Wang et al., 2016].

Семейство белков Bcl-2 состоит из ряда эволюционно консервативных белков, члены которых либо способствуют, либо ингибируют апоптоз – про- или антиапоптотические, соответственно. Антиапоптотические представители этого большого семейства включают собственно Bcl-2, а также Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 и Bcl-2o; проапоптотические белки - Bax, Bad, Bcl-2s, Bak, Bid, Bik, Bim, Krk и Mtd.

Последние данные свидетельствуют о том, что антиапоптотический белок Bcl-2 может являться важным модулятором функционирования глутаматергической нейромедиаторной системы [Machado-Vieira et al., 2011]; Bcl-2 регулирует различные нейробиологические процессы, такие как нейрогенез, морфогенез и синаптическая пластичность, путем обеспечения повышенной выживаемости клеток благодаря блокированию действий проапоптотических белков, таких как Bax [Chao & Korsmeyer, 1998].

Проапоптотический белок Bax является ключевым медиатором апоптотической гибели клеток в нейронах. Bax обычно локализуется в цитозоле или слабо связан с митохондриями. Под влиянием различных стимулов Bax подвергается конформационным изменениям, что приводит к его транслокации, олигомеризации и введению во внешнюю митохондриальную мембрану. Последнее, в свою очередь, способствует каспаза-зависимому или независимому апоптозу [D'Orsi et al., 2015].

До настоящего времени опубликовано лишь ограниченное число исследований о молекулярных механизмах апоптоза, в частности роли белков семейства Bcl-2 при ПТСР; более того, эти работы проведены на моделях животных. С учетом этого, нами были

определены уровни про- и антиапоптотических белков Вах и Bcl-2, соответственно, в плазме крови больных ПТСП, а также ЗЛ.

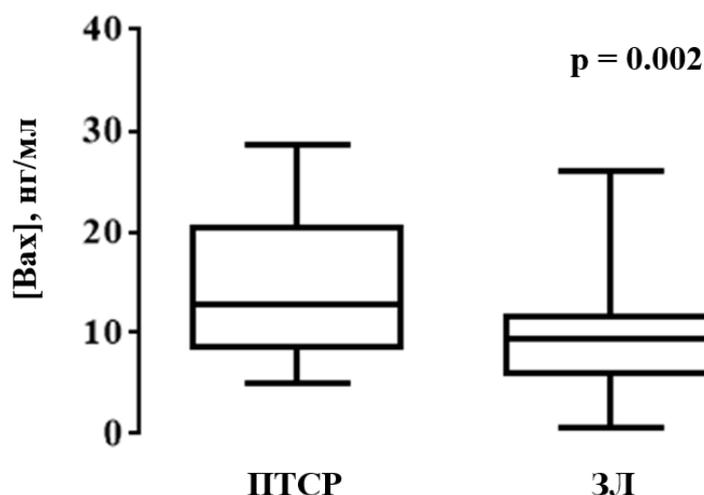


Рисунок 3.1. Содержание Вах в плазме крови больных ПТСП и ЗЛ.

Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

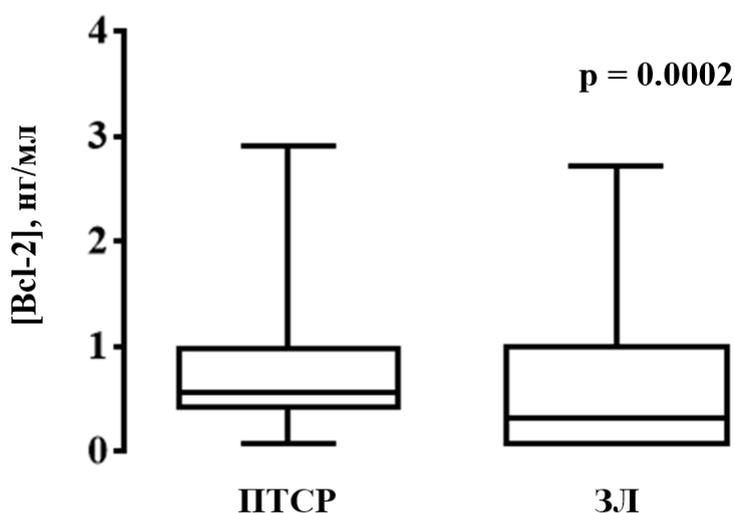


Рисунок 3.2. Содержание Bcl-2 в плазме крови больных ПТСП и ЗЛ.

Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

Согласно полученным результатам, уровень белков Вах и Bcl-2 были, соответственно, в 1.6 ($p = 0.002$) и 2.1 ($p = 0.0002$) раза значимо выше у больных ПТСР по сравнению со ЗЛ (рис. 3.1 и 3.2).

Последние исследования свидетельствуют о снижении количества белка Bcl-2 и экспрессии мРНК в лобной коре головного мозга больных биполярным расстройством [Machado-Vieira et al., 2009a; Kim et al., 2010]. Недавно было показано, что однонуклеотидный полиморфизм гена *BCL2* (rs956572 генотип AA) повышает базальный и стимулирует цитозольный уровни Ca^{2+} в лимфоцитах у больных биполярным расстройством, ассоциированный со значимым понижением уровней Bcl-2 и экспрессии мРНК при данном варианте [Hashimoto et al., 2002; Machado-Vieira et al., 2011, Soeiro-de-Souza et al., 2013]. Некоторые *in vitro* эксперименты показывают, что избыточная экспрессия белка Вах может стимулировать апоптоз [Matter-Reissmann et al., 2002; Chang et al., 2002], в то время как избыточная экспрессия белка Bcl-2, как показано, ингибирует апоптоз [Sun et al., 2002; Tilli et al., 2002]. Таким образом, соотношение Вах/Bcl-2, считается более важным параметром для оценки апоптоза [Jarskog et al., 2004; Li et al., 2013].

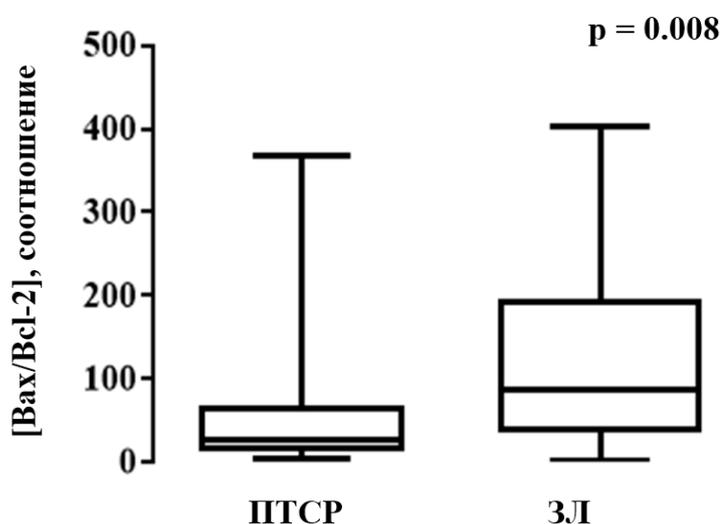


Рисунок 3.3. Соотношение белков Вах/Bcl-2 в плазме крови больных ПТСР и ЗЛ. Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиль); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиль; медиана представлена горизонтальной линией.

Несмотря на то, что уровень обоих белков в плазме крови больных ПТСП был повышен, результаты наших исследований показали, что у больных ПТСП соотношение белков Вах/Vcl-2 было в 1.96 ($p = 0.008$) раз значимо ниже по сравнению со ЗЛ (рис. 3.3), что соответствует данным о пониженном уровне апоптоза.

На следующем этапе мы исследовали вовлеченность белков семейства аннексинов в патомеханизме ПТСП. В последние годы большое внимание уделяется изучению биологической активности белков семейства аннексинов. Аннексины являются Ca^{2+} -регулируемыми фосфолипидсвязывающими белками, широко экспрессируемыми во всех эукариотических клетках, за исключением дрожжей [Gerke et al., 2005; Tomas et al., 2004]. Аннексины были разделены на пять групп. Группа А включает 12 членов (аннексины А1-А11 и А13), обнаруженные у позвоночных (млекопитающие); Аннексины групп В, С, D и Е встречаются у беспозвоночных, грибов/плесени, растений и простейших, соответственно [Mussunoor & Murray, 2008]. Аннексины представляют собой цитозольные белки, распределенные как в клеточной цитоплазме, так и в ядерных мембранах. Они проявляют различные биологические функции, опосредуя взаимодействия между белками в клеточных мембранах с другими белками в клетках, в ядерной мембране и во внеклеточном матриксе [Perron et al., 1997; Moss & Morgan, 2004; Rosenbaum et al., 2011; Wang et al., 2014].

Аннексин-А5, как и другие аннексины, не выделяется из нормальных клеток; источником внеклеточного (растворимого) аннексина-А5 являются апоптотические и разрушенные клетки [Reutelingsperger & van Heerde, 1997]. В механизме действия аннексина-А5, как и других аннексинов, большое значение имеет их свойство связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами, в том числе с фосфатидилсерином, экспозиция которого на клеточной мембране является одним из ранних признаков апоптоза [Swairjo et al., 1995; Vanags et al., 1996; Hong et al., 2014]. Кроме того, исследования последних лет показали, что аннексин-А5 обладает антикоагулянтными и противовоспалительными свойствами: связываясь с экспонированным на поверхности апоптотических клеток молекулами фосфатидилсерина он ингибирует прокоагулянтную и провоспалительную активность гибнущих клеток [Петрищев и др., 2008; Reutelingsperger & van Heerde, 1997].

Другим членом семейства аннексинов является аннексин-A11, который участвует в передаче сигналов по кальциевым каналам, а также в апоптозе, везикулярном транспорте, клеточном росте и терминальной фазе клеточного деления [Shibata et al., 2015].

Согласно нашим исследованиям, уровень аннексина-A5 был значимо в 2.3 раза ниже ($p = 0.0001$) у больных ПТСР по сравнению со ЗЛ (рис. 3.4).

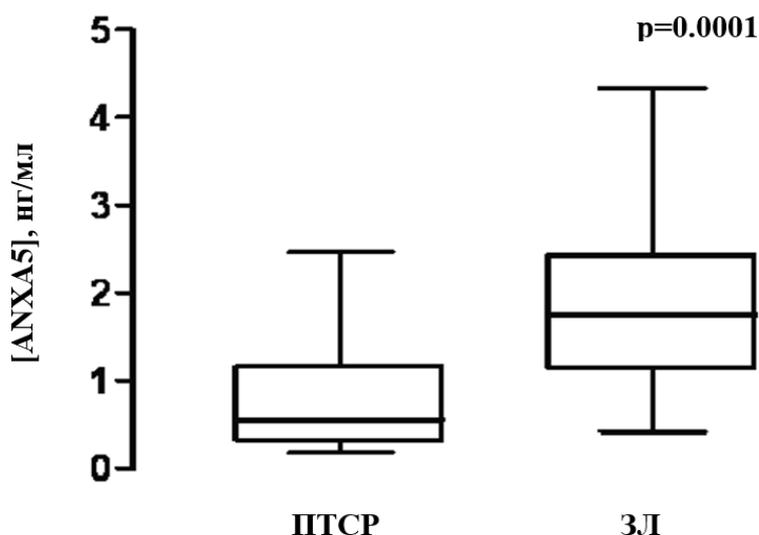


Рисунок 3.4. Содержание аннексина-A5 в плазме крови больных ПТСР и ЗЛ. Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

Таким образом, пониженное содержание растворимого аннексина-A5 в плазме крови больных ПТСР, по сравнению с нормой, свидетельствует о том, что для этих больных характерен низкий уровень апоптоза, что может являться одной из причин развития вялотекущего воспалительного процесса при этом заболевании. В этой связи интересно отметить тот факт, что, по результатам недавно проведенного исследования, длительный прием нейрорептиков приводит к повышению уровня аннексина-A5, коррелирующему с понижением уровня TNF- α у хронических больных шизофренией [Francesconi et al., 2011]. Однако зависимость между уровнями аннексина-A5 в крови и

генотипами однонуклеотидного функционального полиморфизма rs11575945 (-1С/Т) консенсусной последовательности Козак регуляторного участка гена аннексина-А5 при ПТСП не изучена.

Далее нами была изучена возможная ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов генов *BCL2* rs956572, rs1801018; *BAX* rs1057369; *ANXA5* rs11575945 и *ANXA11* rs1049550 вышеупомянутых белков с ПТСП. Согласно полученным данным генотипирования, частота минорного аллеля полиморфизма rs956572*А гена *BCL2* была выше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.64 vs. 0.41, $p_{\text{nominal}} = 6.02\text{E-}11$, OR = 2.59, 95%CI: 1.94 – 3.44). Число носителей данного аллеля было больше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.87 vs. 0.65, $p_{\text{nominal}} = 4.11\text{E-}7$, OR = 3.53, 95%CI: 2.14 – 5.81). Кроме того, мы обнаружили, что частота минорного аллеля rs1801018*G гена *BCL2* ниже у больных по сравнению со ЗЛ (0.4 vs. 0.5, $p_{\text{nominal}} = 0.0036$, OR = 0.66, 95% CI: 0.50 – 0.87). А число носителей минорного аллеля rs1801018*G было ниже у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.61 vs. 0.79, $p_{\text{nominal}} = 8.6\text{E-}5$, OR = 0.42, 95% CI: 0.27 – 0.65). В соответствии с полученными данными, частота минорного аллеля полиморфизма rs1057369*G гена *BAX* была ниже у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.445 vs. 0.555, $p_{\text{nominal}} = 0.003$, OR = 0.66, 95%CI: 0.50 – 0.87). Однако не выявлено значимых отличий числа носителей данного аллеля в группах больных ПТСП и ЗЛ. Значения p после коррекции по Бонферрони приведены в таблице 3.1.

Согласно полученным данным, частота минорного аллеля полиморфизма rs1049550*А гена *ANXA11* была ниже у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.33 vs. 0.42, $p_{\text{nominal}} = 0.013$, OR = 0.70, 95%CI: 0.52 – 0.93). Однако значимых отличий числа носителей данного аллеля (доминантная модель) в группах больных ПТСП и ЗЛ не выявлено.

Таблица 3.1. Ассоциация полиморфизмов генов *BAX*, *BCL2*, *ANXA5*, *ANXA11* и риска возникновения ПТСР.

Ген, SNP		ПТСР	ЗЛ	OR	95% CI	P _{corrected}
<i>BCL2</i> rs956572						
Генотип	GG	27 (0.135)	71 (0.355)			
	GA	89 (0.445)	94 (0.47)			
	AA	84 (0.42)	35 (0.175)			
Аллели	G	143 (0.36)	236 (0.59)			1.20E-10
	A	257 (0.64)	164 (0.41)	2.59	[1.94 – 3.44]	
Доминантная модель	A	173 (0.87)	129 (0.65)	3.53	[2.14 – 5.81]	8.22E-07
Рецессивная модель	A	84 (0.42)	35 (0.175)	3.41	[2.15 – 5.41]	2.26E-07
<i>BCL2</i> rs1801018						
Генотип	AA	78 (0.39)	42 (0.21)			
	AG	83 (0.415)	114 (0.57)			
	GG	39 (0.195)	44 (0.22)			
Аллели	A	239 (0.6)	198 (0.5)			0.0072
	G	161 (0.4)	202 (0.5)	0.66	[0.50 – 0.87]	
Доминантная модель	G	122 (0.61)	158 (0.79)	0.42	[0.27 – 0.65]	1.70E-04
Рецессивная модель	G	39 (0.195)	44 (0.22)	0.86	[0.53 – 1.39]	0.54
<i>BAX</i> rs1057369						
Генотип	AA	32 (0.16)	36 (0.18)			
	AG	155 (0.775)	106 (0.53)			
	GG	13 (0.065)	58 (0.29)			
Аллели	A	220 (0.55)	178 (0.445)			0.003
	G	180 (0.445)	222 (0.555)	0.66	[0.50 – 0.87]	
Доминантная модель	G	168 (0.84)	164 (0.82)	0.87	[0.52 – 1.46]	0.59
Рецессивная модель	G	13 (0.065)	58 (0.29)	0.17	[0.09 – 0.32]	<0.1E-06

Таблица 3.1. (продолжение)

Ген, SNP		ПТСР	ЗЛ	OR	95% CI	$p_{corrected}$
ANXA5 rs11575945						
Генотип	CC	63 (0.79)	53 (0.71)			
	CT	14 (0.17)	21 (0.28)			
	TT	3 (0.04)	1 (0.01)			
Аллели	C	140 (0.875)	127 (0.85)			0.47
	T	20 (0.125)	23 (0.15)	0.79	[0.41 – 1.50]	
Доминантная модель	T	17 (0.21)	22 (0.29)	0.65	[0.31 – 1.35]	0.25
Рецессивная модель	T	3 (0.04)	1 (0.01)	0.35	[0.04 – 3.41]	0.34
ANXA11 rs1049550						
Генотип	GG	83 (0.415)	68 (0.34)			
	GA	101 (0.505)	97 (0.485)			
	AA	16 (0.08)	35 (0.175)			
Аллели	G	267 (0.67)	233 (0.58)			0.013
	A	133 (0.33)	167 (0.42)	0.70	[0.52 – 0.93]	
Доминантная модель	A	117 (0.59)	132 (0.66)	0.73	[0.48 – 1.09]	0.12
Рецессивная модель	A	16 (0.08)	35 (0.175)	0.41	[0.22 – 0.77]	0.004

* Данные представлены абсолютными и относительными (в скобках) значениями.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что уровни проапоптотического белка Вах и антиапоптотического белка Вcl-2 были значительно увеличены в плазме крови больных ПТСР по сравнению со ЗЛ. Однако соотношение Вах/Вcl-2, которое является более информативным параметром, чем уровни отдельных белков, было снижено при ПТСР.

Результаты наших исследований показали также, что уровень аннексина-А5 при ПТСР был значительно ниже чем у ЗЛ. Согласно нашим предыдущим исследованиям, уровни ряда провоспалительных (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) и хемотаксических (IL-8 и MCP-1) цитокинов, были значительно повышены у больных ПТСР [Оганесян и др., 2012]. Следовательно отмеченный низкий уровень апоптоза может быть одним из факторов,

обуславливающих развитие вялотекущего воспалительного процесса, характерного при ПТСР.

3.2. МАРКЕРЫ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ПРИ ПТСР

Способность изменений пластичности является фундаментальной характеристикой нервной системы и лежит в основе многих аспектов развития, гомеостаза, обучения и памяти. Пластичность необходима для восстановления нервной системы после травмы, инсульта и других патологических процессов. Выделяют две формы синаптической пластичности: кратковременная синаптическая пластичность, которая длится секунды и минуты, и долговременная синаптическая пластичность, которая продолжается часы, месяцы и годы. Долговременные виды синаптической пластичности формируются на основе кратковременных, и лежат в основе когнитивных функций нервной системы – обучения, памяти, внимания, психомоторной координации и др [Pittenger, 2013]. Сильный стресс также может ингибировать долговременную синаптическую пластичность, а хронический – усиливать долговременный депрессионный поведенческий профиль в гиппокампе.

Комплексины представляют собой небольшие цитозольные белки, которые связываются с растворимым N-этилмалеимид-чувствительным комплексом рецепторов белка (SNARE) для регуляции экзоцитоза синаптических пузырьков. Комплексины 1 и 2 являются двумя основными изоформами в головном мозге [Tang, 2009]. Значительные изменения уровней экспрессии комплексина 2 наблюдаются в ряде неврологических и психических расстройств, включая биполярное расстройство [Eastwood & Harrison, 2000], болезнь Хантингтона [DiProspero et al., 2004], шизофрению [Eastwood & Harrison, 2000], болезнь Паркинсона [Brose, 2008] и болезнь Альцгеймера [Tannenberg et al., 2006]. Развитие и прогрессирование ПТСР также характеризуется когнитивными нарушениями, что может привести к измененным процессам развития нервной системы и синаптической пластичности [Seal et al., 2016].

Учитывая вышесказанное, нами был определен уровень белка комплексина 2, как маркер синаптической пластичности, в плазме крови больных ПТСР и ЗЛ, а также

возможная ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов гена *CPLX2* rs1366116 и rs3892909 с ПТСП.

Согласно результатам проведенного нами исследования концентрация комплексина 2 в плазме крови больных ПТСП была в среднем 1.2 ($p = 0.03$) раза значимо ниже по сравнению со ЗЛ (рис. 3.5).

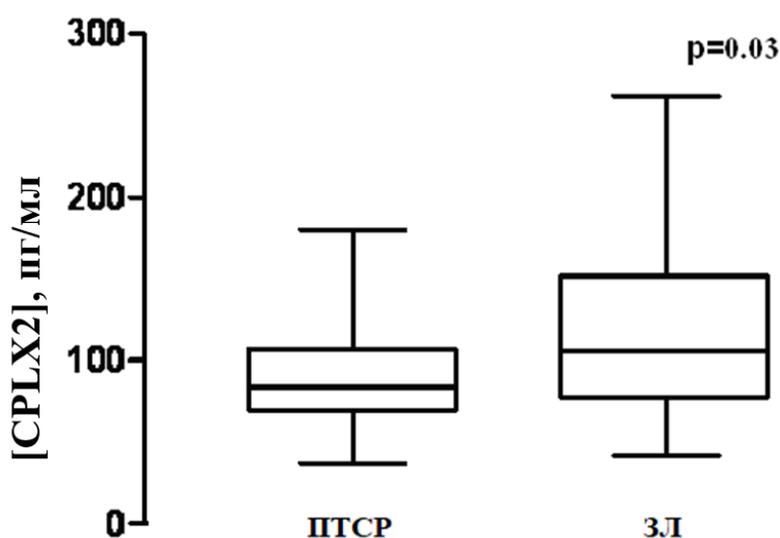


Рисунок 3.5. Содержание комплексина 2 в плазме крови больных ПТСП и ЗЛ. Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

На основе данных генотипирования было показано, что частота минорного аллеля полиморфизма rs1366116*Т гена *CPLX2* была 1.8 раза значимо выше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.4 vs 0.24, $p_{\text{nominal}} = 0.002$, OR = 2.13, 95% CI: 1.32 – 3.45). Также число носителей данного аллеля было в 1.5 раза значимо больше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.61 vs 0.4, $p_{\text{nominal}} = 0.008$, OR = 2.34, 95% CI: 1.24 – 4.40). Значения p после коррекции по Бонферрони приведены в таблице 3.2.

Таблица 3.2. Ассоциация полиморфизмов генов *BDNF*, *CPLX2*, *NTNG1*, *NGF*, *NGFR*, *CHN1* и риска возникновения ПТСР.

Ген, SNP		ПТСР	ЗЛ	OR	95% CI	$p_{corrected}$
<i>BDNF</i> rs6265						
Генотип	GG	150 (0.75)	129 (0.645)			
	GA	48 (0.24)	67 (0.335)			
	AA	2 (0.01)	4 (0.02)			
Аллели	G	348 (0.87)	325 (0.81)			0.03
	A	52 (0.13)	75 (0.19)	0.65	[0.44 – 0.95]	
Доминантная модель	A	50 (0.25)	71 (0.36)	0.39	[0.61 – 0.93]	0.02
Рецессивная модель	A	2 (0.01)	4 (0.02)	0.50	[0.09 – 2.73]	0.41
<i>CPLX2</i> rs1366116						
Генотип	CC	34 (0.39)	45 (0.6)			
	CT	36 (0.41)	24 (0.32)			
	TT	17 (0.2)	6 (0.08)			
Аллели	C	104 (0.6)	114 (0.76)			0.006
	T	70 (0.4)	36 (0.24)	2.13	[1.32 – 3.45]	
Доминантная модель	T	53 (0.61)	30 (0.4)	2.34	[1.24 – 4.40]	0.02
Рецессивная модель	T	17 (0.2)	6 (0.08)	2.79	[1.04 – 7.50]	0.1
<i>CPLX2</i> rs3892909						
Генотип	CC	16 (0.18)	15 (0.2)			
	CT	45 (0.52)	41 (0.55)			
	TT	26 (0.3)	19 (0.25)			
Аллели	C	77 (0.44)	71 (0.47)			0.58
	T	97 (0.56)	79 (0.53)	1.13	[0.73 – 1.76]	
Доминантная модель	T	71 (0.82)	60 (0.8)	1.11	[0.51 – 2.43]	0.8
Рецессивная модель	T	26 (0.3)	19 (0.25)	1.26	[0.63 – 2.51]	0.52
<i>NTNG1</i> rs628117						
Генотип	AA	47 (0.36)	36 (0.34)			
	AG	66 (0.5)	43 (0.41)			
	GG	19 (0.14)	26 (0.25)			
Аллели	A	160 (0.6)	115 (0.55)			0.2
	G	104 (0.4)	95 (0.45)	1.27	[0.88 – 1.84]	
Доминантная модель	G	85 (0.64)	69 (0.66)	1.06	[0.62 – 1.82]	0.8
Рецессивная модель	G	19 (0.14)	26 (0.25)	0.51	[0.27 – 0.97]	0.04

Таблица 3.2. (продолжение)

Ген, SNP		ПТСР	ЗЛ	OR	95% CI	p _{corrected}
NGF rs6330						
Генотип	GG	66 (0.33)	130 (0.65)			
	GA	106 (0.53)	58 (0.29)			
	AA	28 (0.14)	12 (0.06)			
Аллели	G	238 (0.6)	318 (0.8)			2.04E-09
	A	162 (0.4)	82 (0.2)	2.64	[1.93 – 3.61]	
Доминантная модель	A	134 (0.67)	70 (0.35)	3.77	[2.49 – 5.7]	4.2E-10
Рецессивная модель	A	28 (0.14)	12 (0.06)	2.55	[1.25 – 5.2]	0.015
NGF rs4839435						
Генотип	GG	130 (0.65)	85 (0.425)			
	GA	66 (0.33)	97 (0.485)			
	AA	4 (0.02)	18 (0.09)			
Аллели	G	326 (0.8)	267 (0.67)			4.00E-06
	A	74 (0.2)	133 (0.33)	0.46	[0.33 – 0.63]	
Доминантная модель	A	70 (0.35)	115 (0.58)	0.4	[0.27 – 0.6]	1.20E-05
Рецессивная модель	A	4 (0.02)	18 (0.09)	0.21	[0.07 – 0.6]	0.004
NGFR rs11466155						
Генотип	CC	109 (0.545)	110 (0.55)			
	CT	82 (0.41)	75 (0.375)			
	TT	9 (0.045)	15 (0.075)			
Аллели	C	300 (0.75)	295 (0.74)			0.69
	T	100 (0.25)	105 (0.26)	0.94	[0.68 – 1.29]	
Доминантная модель	T	91 (0.46)	90 (0.45)	1.02	[0.69 – 1.51]	1
Рецессивная модель	T	9 (0.045)	15 (0.075)	0.58	[0.25 – 1.36]	0.2
NGFR rs734194						
Генотип	TT	164 (0.82)	109 (0.545)			
	TG	34 (0.17)	74 (0.37)			
	GG	2 (0.01)	17 (0.085)			
Аллели	T	362 (0.9)	292 (0.73)			2.74E-10
	G	38 (0.1)	108 (0.27)	0.28	[0.19 – 0.42]	
Доминантная модель	G	36 (0.18)	91 (0.46)	0.26	[0.17 – 0.42]	8.82E-09
Рецессивная модель	G	2 (0.01)	17 (0.085)	0.11	[0.03 – 0.48]	8.4E-04

Таблица 3.2. (продолжение)

Ген, SNP		ПТСР	ЗЛ	OR	95% CI	P _{corrected}
<i>CHN1</i> rs14228						
Генотип	CC	79 (0.395)	82 (0.41)			
	CT	86 (0.43)	62 (0.31)			
	TT	35 (0.175)	56 (0.28)			
Аллели	C	244 (0.61)	226 (0.565)			0.39
	T	156 (0.39)	174 (0.435)	0.83	[0.63 – 1.1]	
Доминантная модель	T	121 (0.6)	118 (0.59)	1.06	[0.71 – 1.59]	0.76
Рецессивная модель	T	35 (0.175)	56 (0.28)	0.55	[0.34 – 0.88]	0.025
<i>CHN1</i> rs2646153						
Генотип	AA	50 (0.25)	57 (0.285)			
	AG	86 (0.43)	90 (0.45)			
	GG	64 (0.32)	53 (0.265)			
Аллели	A	186 (0.465)	204 (0.51)			0.2
	G	214 (0.535)	196 (0.49)	1.20	[0.90 – 1.60]	
Доминантная модель	G	150 (0.75)	143 (0.72)	1.20	[0.77 – 1.86]	0.43
Рецессивная модель	G	64 (0.32)	53 (0.265)	1.31	[0.85 – 2.01]	0.23

* Данные представлены абсолютными и относительными (в скобках) значениями.

Интересно, что в зависимости от генотипов полиморфизма rs1366116 гена *CPLX2* были обнаружены различия в уровнях белка комплексина 2 в плазме крови больных ПТСР. Таким образом, у носителей минорного аллеля полиморфизма rs1366116*Т гена *CPLX2* уровень белка комплексина 2 в плазме крови был в 1.6 раза значимо ниже ($p = 0.0029$), по сравнению с гомозиготами по мажорному аллелю (рис. 3.6).

Белок химерин 1 является регулятором Rho ГТФазного белка (GAP), который преимущественно экспрессируется в нейронах и играет важную роль в механизмах нейрональной сигнальной трансдукции [Recabarren & Alarcón, 2017]. Известно, что химерин 1 связан с различными нейродегенеративными заболеваниями, такими как

болезнь Альцгеймера [Kato et al., 2015], Паркинсона [Carugo et al., 2014] и боковой амиотрофический склероз [Lederer et al., 2007].

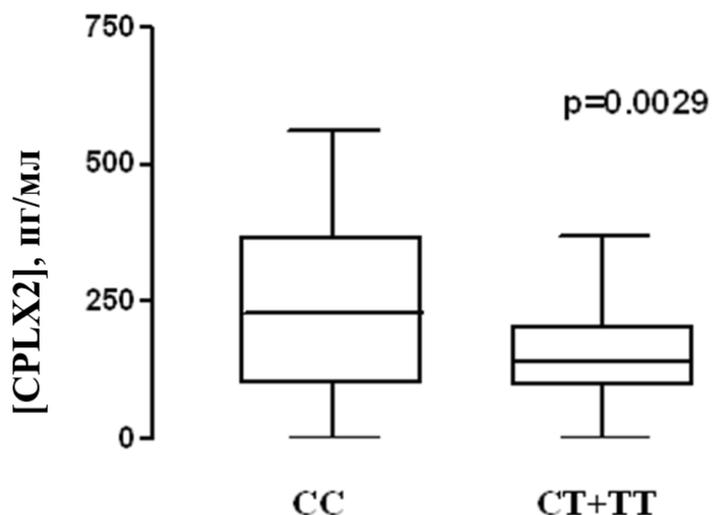


Рисунок 3.6. Содержание комплексина 2 в плазме крови больных ПТСП в зависимости от генотипов полиморфизма rs1366116 гена *CPLX2*.

Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

Известно, что факторы роста и их рецепторы играют важную роль в процессах развития нервной системы и синаптической пластичности, и вовлечены в патогенезе ПТСП. Нетрины, включая нетрин G1 (NTNG1), участвуют в аксональном наведении в развивающемся мозге, и являются важными факторами генетического риска для психозов [Wilcox & Quadri, 2014].

Нейротрофины – семейство регуляторных белков нервной ткани, которые относятся к семейству факторов роста, и синтезируются в нейронах, микроглии и глии. Эти белки стимулируют рост, способствуют дифференцировке и поддержанию жизнеспособности и функционирования периферических и центральных нейронов. К числу наиболее изученных нейротрофинов относятся нейротрофический фактор мозга (BDNF) и фактор роста нервов (NGF), являющиеся основными медиаторами синаптической и морфологической пластичности, роста нейронов, выживаемости и дифференцировки, особенно в развивающемся мозге, тем самым могут играть важную роль в патогенезе ПТСП [Qiao, 2014].

С учетом этого, нами была определена возможная ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов генов *CPLX2* rs1366116, rs3892909; *BDNF* rs6265; *NTNG1* rs628117; *NGF* rs6330, rs4839435; *NGFR* rs11466155, rs734194; и *CHN1* rs14228, rs2646153 с ПТСП. Согласно полученным данным генотипирования, частота минорного аллеля полиморфизма rs6265*А гена *BDNF* была значимо ниже у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.13 vs 0.19, $p_{\text{nominal}} = 0.026$, OR = 0.65, 95% CI: 0.44 – 0.95). Также число носителей данного аллеля было значимо меньше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.25 vs 0.36, $p_{\text{nominal}} = 0.02$, OR = 0.39, 95% CI: 0.61 – 0.93).

Кроме того, мы обнаружили, что минорный аллель rs6330*А гена *NGF* был чрезмерно представлен у пациентов с ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.4 vs 0.2, $p_{\text{nominal}} = 1.02\text{E-}9$, OR = 2.64, 95% CI: 1.93 – 3.61). А число носителей данного аллеля было значимо больше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.67 vs 0.35, $p_{\text{nominal}} = 2.1\text{E-}10$, OR = , 95% CI: 2.49 – 5.7). С другой стороны, частота (0.2 vs 0.33, $p_{\text{nominal}} = 2.0\text{E-}6$, OR = 0.46, 95% CI: 0.33 – 0.63) и число носителей (0.35 vs 0.58, $p_{\text{nominal}} = 6.0\text{E-}6$, OR = 0.4, 95% CI: 0.27 – 0.6) минорного аллеля rs4839435*А гена *NGF* были значимо меньше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ. А также частота минорного аллеля полиморфизма rs734194*Т гена *NGFR* была значимо ниже у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.1 vs 0.27, $p_{\text{nominal}} = 1.37\text{E-}10$, OR = 0.28, 95% CI: 0.19 – 0.42). То же самое относится к числу носителей rs734194*Т аллеля (0.18 vs 0.46, $p_{\text{nominal}} = 4.41\text{E-}9$, OR = 0.26, 95% CI: 0.17 – 0.42). Значения p после коррекции по Бонферрони приведены в таблице 3.2.

Обобщая результаты следует отметить, что пониженное содержание белка комплексина 2 в плазме крови больных ПТСП вероятно свидетельствует о нарушении СП. Кроме того, однонуклеотидный полиморфизм гена *CPLX2* rs1366116 связан с пониженным уровнем этого белка в периферической крови.

Отмечена также положительная ассоциация однонуклеотидного полиморфизма гена *NGF* rs6330, и отрицательная ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов генов *BDNF* rs6265; *NGF* rs4839435 и *NGFR* rs734194 с ПТСП.

Среди изученных генов, связанных с СП, *CHN1* кодирует белок с ГТФазной активностью для рецепторов *gas*-родственного *p21-gas* и эфира *форбола*. Роль данного белка мало изучена, а исследования связанных с ПТСП отсутствуют. Наши результаты не

выявили ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов гена *CHN1* rs14228 и rs2646153 с ПТСР.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что изученные маркеры СП наследственно обусловлены при ПТСР и, возможно, отражают характерное для данной патологии нарушение когнитивных функций.

3.3. ФАКТОРЫ ТРАНСКРИПЦИИ ПРИ ПТСР

Факторы транскрипции являются важными регуляторами экспрессии генов, при помощи специфического взаимодействия с сайтами связывания транскрипционных факторов, расположенных в области промоторов [Cooper, 2000]. c-Fos - это протоонкоген, который индуцируется в ответ на различные стимулы и широко используется в качестве маркера активации нейронов в результате воздействия стресса. Также предлагается, что он принимает участие в механизмах обучения и памяти [Alberini, 2009]. c-Fos является членом семейства транскрипционных факторов, состоящих из c-Fos, FosB и связанных с Fos антигенов 1 и 2 (Fra-1 и Fra-2) [Herdegen & Leah, 1998]. Fos-белки образуют гетеродимерные комплексы с белками Jun, образуя белок-1-активатор транскрипционного фактора-1 (AP-1), который регулирует экспрессию гена путем связывания с последовательностью распознавания AP-1, обнаруженной во множестве целевых (target) генов [Fleischmann et al., 2003]. Фактор транскрипции AP-1 усиливает транскрипцию генов, продукты которых участвуют в ряде процессов, включая образование синаптической пластичности и долговременной памяти [Sanyal et al., 2002; Fleischmann et al., 2003; Alberini, 2009; Glyvuk et al., 2010]. AP-1 участвует в биогенезе синаптических везикул, в сборке их мембран, при передаче рецептора на дендриты, а также контролирует клеточную дифференцировку, пролиферацию и апоптоз [Glyvuk et al., 2010]. Нарушенная функциональная активность AP-1 наблюдалась при различных заболеваниях ЦНС, повреждении головного мозга, когнитивном расстройстве и старении [Raivich & Behrens, 2006].

До настоящего времени опубликовано лишь ограниченное число исследований, связанных с ролью транскрипционных факторов при ПТСР; эти работы, в основном, проведены на моделях животных [Kung et al., 2010; Hoffman et al., 2014]. С учетом этого,

нами были определены генетические варианты *FOS* rs7101, rs1063169; *JUN* rs11688; и *IER5* rs6425663 генов у больных ПТСП и ЗЛ.

Таблица 3.3. Ассоциация полиморфизмов генов *FOS*, *JUN* и *IER5* риска возникновения ПТСП.

Ген, SNP		ПТСП	ЗЛ	OR	95% CI	P _{corrected}
<i>FOS</i> rs7101						
Генотип	CC	12 (0.06)	94 (0.47)			
	CT	71 (0.355)	85 (0.43)			
	TT	117 (0.585)	21 (0.1)			
Аллели	C	95 (0.24)	273 (0.68)			
	T	305 (0.76)	127 (0.31)	6.9	[5.05 – 9.43]	4.04E-37
Доминантная модель	T	188 (0.94)	106 (0.53)	13.9	[7.3 – 26.5]	1.31E-21
Рецессивная модель	T	117 (0.585)	21 (0.1)	12.0	[7.06 – 20.5]	2.0E-07
<i>FOS</i> rs1063169						
Генотип	GG	161 (0.8)	92 (0.46)			
	GT	36 (0.18)	80 (0.4)			
	TT	3 (0.02)	28 (0.14)			
Аллели	G	358 (0.9)	264 (0.66)			
	T	42 (0.1)	136 (0.34)	0.23	[0.16 – 0.33]	1.50E-15
Доминантная модель	T	39 (0.2)	108 (0.54)	0.21	[0.13 – 0.32]	1.70E-12
Рецессивная модель	T	3 (0.02)	28 (0.14)	0.09	[0.03 – 0.31]	2.1E-06
<i>JUN</i> rs11688						
Генотип	GG	34 (0.17)	47 (0.24)			
	GA	113 (0.565)	111 (0.56)			
	AA	53 (0.265)	42 (0.2)			
Аллели	G	181 (0.45)	205 (0.51)			
	A	219 (0.55)	195 (0.49)	1.27	[0.96 – 1.68]	0.09
Доминантная модель	A	166 (0.83)	153 (0.77)	1.5	[0.92 – 2.46]	0.11
Рецессивная модель	A	53 (0.265)	42 (0.2)	1.36	[0.85 – 2.16]	0.2
<i>IER5</i> rs6425663						
Генотип	GG	29 (0.145)	20 (0.1)			
	GT	78 (0.39)	74 (0.37)			
	TT	93 (0.465)	106 (0.53)			
Аллели	G	136 (0.34)	114 (0.285)			
	T	264 (0.66)	286 (0.715)	0.77	[0.57 – 1.0]	0.09
Доминантная модель	T	171 (0.86)	180 (0.9)	0.66	[0.36 – 1.20]	0.17
Рецессивная модель	T	93 (0.465)	106 (0.53)	0.77	[0.52 – 1.14]	0.19

* Данные представлены абсолютными и относительными (в скобках) значениями.

Согласно полученным данным генотипирования, частота минорного аллеля полиморфизма rs7101*Т гена *FOS* была значимо выше у больных ПТСР по сравнению со ЗЛ (0.76 vs 0.31, $p_{\text{nominal}} = 2.02\text{E-}37$, OR = 6.9, 95% CI: 5.05 – 9.43). Число носителей данного аллеля было значимо больше у больных ПТСР по сравнению со ЗЛ (0.94 vs 0.53, $p_{\text{nominal}} = 6.57\text{E-}22$, OR = 13.9, 95% CI: 7.3 – 26.5). С другой стороны, частота (0.1 vs 0.34, $p_{\text{nominal}} = 7.48\text{E-}16$, OR = 0.23, 95% CI: 0.16 – 0.33) и число носителей (0.2 vs. 0.54, $p_{\text{nominal}} = 8.51\text{E-}13$, OR = 0.21, 95% CI: 0.13 – 0.32) минорного аллеля rs1063169*Т гена *FOS* были значимо меньше у больных ПТСР по сравнению со ЗЛ. Наши результаты не выявили ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов генов *JUN* rs11688 и *IER5* rs6425663 с ПТСР. Значения p после коррекции по Бонферрони приведены в таблице 3.3.

3.4. ОТНОСИТЕЛЬНАЯ ДЛИНА ТЕЛОМЕР ПРИ ПТСР

Предполагается, что длина теломер является клеточным маркером для возрастных заболеваний, а также психосоциального стресса. Теломеры являются защитными некодирующими комплексами, представленными TTAGGG тандемными повторами на концах хромосом и участвуют в поддержании генетической стабильности, регуляции экспрессии генов и предотвращении хромосомного слияния [Weinrich et al., 1997; Chan & Blackburn, 2004]. Они могут укорачиваться во время повторных клеточных делений, старения и в ответ на некоторые факторы окружающей среды, такие как психологический [Epel et al., 2004] и физиологический стресс [Lindqvist et al., 2015], курение, ожирение и старческий возраст родителей [Morla et al., 2006; Malaspina et al., 2014].

Многочисленные исследования показали, что длина теломер коррелирует с ухудшением состояния здоровья и прогнозирует смертность при определенных психических расстройствах [Simon et al., 2006; Lindqvist et al., 2015; Polho et al., 2015]. Кроме того, было также показано, что длина теломер коррелирует с когнитивной способностью у здоровых людей [Valdes et al., 2010; Yaffe et al., 2011]. Последние исследования выявили, что наряду с известными биохимическими и физиологическими стрессорами психический травматический стресс также ассоциирован с укорочением теломер [Epel et al., 2004; Damjanovic et al., 2007; Codd et al., 2010; Codd et al., 2013].

Длина теломер в здоровых клетках строго регулируется ткане- и клеточно-специфическим образом и зависит от скорости митотического цикла, активности теломеразы и факторов, связанных с теломеразой. Теломераза является рибонуклеопротеиновой полимеразой с обратной транскрипцией, состоящей из двух основных компонентов – обратной транскриптазы (TERT) и теломеразной РНК (TERC), служащей в качестве матрицы [Weinrich et al., 1997]. В здоровом организме человека теломераза имеет высокую активность в зародышевых и стволовых клетках и проявляет слабую активность в лейкоцитах [Beckaert et al., 2004; Niyama & Niyama, 2007; Xu et al., 2017]. Ряд исследований выявили связь полиморфизмов генов, кодирующих теломеразные компоненты, с несколькими психическими расстройствами, такими как шизофрения, большое депрессивное расстройство, депрессия и др. [Rao et al., 2016; Wei, et al., 2016; Michalek et al., 2017].

До настоящего времени опубликовано лишь ограниченное число исследований, связанных с длиной теломер при ПТСР. Анализ генетических ассоциаций между вариантами *TERC* и *TERT* и ПТСР ранее не был изучен. С учетом этого, нами была определена оДТЛ у больных ПТСР и ЗЛ, а также исследована ассоциация между оДТЛ, функциональных SNP генов *TERC* и *TERT* и ПТСР.

Нами были исследования были вовлечены 41 больной ПТСР и 49 ЗЛ. Согласно полученным данным, была выявлена отрицательная связь между оДТЛ и возрастом у ЗЛ, хотя эта разница была не значима. Это может быть связано с тем, что возрастной диапазон субъектов был узким (46 ± 8 лет, из которых 53% находились в диапазоне 40 – 50 лет). С другой стороны, било показано, что оДТЛ в 1,5 раза короче (0.91 ± 0.07 vs. 1.33 ± 0.14 , $p = 0.03$) у больных ПТСР по сравнению со ЗЛ (рис. 3.7).

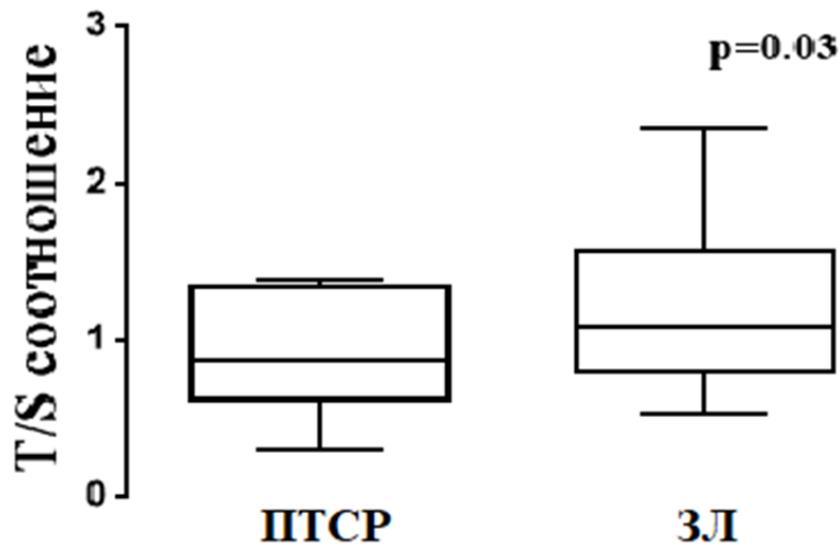


Рисунок 3.7. оДТЛ у больных ПТСР и ЗЛ.

Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

Наши результаты подтверждают теорию ускоренного старения при ПТСР, что было отмечено при других психических расстройствах [Simon et al., 2006; Damjanovic et al., 2007; Powell et al., 2018].

Далее были определены ассоциации между полиморфизмами *TERC* rs12696304, *TERT* rs7726159 и rs2736100 и риском ПТСР на основе частоты встречаемости минорного аллеля, доминантной и рецессивной моделей генетических ассоциаций (табл. 3.4). Распределение генотипов для всех отобранных SNP во всех исследуемых группах соответствовало закону Харди-Вайнберга.

Таблица 3.4. Ассоциация полиморфизмов генов *TERC* и *TERT* риска возникновения ПТСР.

Ген, SNP		ПТСР	ЗЛ	OR	95% CI	P _{corrected}
<i>TERC</i> rs12696304						
Генотип	CC	16 (0.39)	24 (0.49)			
	CG	19 (0.46)	19 (0.39)			
	GG	6 (0.15)	6 (0.12)			
Аллели	C	51 (0.62)	67 (0.68)			0.39
	G	31 (0.38)	31 (0.32)	1.31	[0.71 – 1.4]	
Доминантная модель	G	25 (0.51)	25 (0.61)	1.5	[0.65 – 3.48]	0.34
Рецессивная модель	G	6 (0.12)	6 (0.15)	1.23	[0.42 – 4.15]	0.74
<i>TERT</i> rs7726159						
Генотип	GG	17 (0.41)	17 (0.35)			
	GT	18 (0.44)	25 (0.51)			
	TT	6 (0.15)	7 (0.14)			
Аллели	G	52 (0.63)	59 (0.60)			0.66
	T	30 (0.37)	39 (0.40)	0.87	[0.48 – 1.60]	
Доминантная модель	T	24 (0.59)	32 (0.65)	0.75	[0.32 – 1.77]	0.51
Рецессивная модель	T	6 (0.15)	7 (0.14)	1.03	[0.32 – 3.34]	1
<i>TERT</i> rs2736100						
Генотип	GG	8 (0.20)	20 (0.41)			
	GT	14 (0.34)	19 (0.39)			
	TT	19 (0.46)	10 (0.20)			
Аллели	G	30 (0.37)	59 (0.60)			0.005
	T	52 (0.63)	39 (0.40)	2.62	[1.43 – 4.8]	
Доминантная модель	T	33 (0.81)	29 (0.59)	2.85	[1.09 – 7.43]	0.09
Рецессивная модель	T	22 (0.54)	39 (0.80)	0.29	[0.14 – 0.61]	0.027

* Данные представлены абсолютными и относительными (в скобках) значениями.

Согласно полученным данным генотипирования, частота минорного аллеля полиморфизма rs2736100*Т гена *TERT* была в 1.6 раза значимо выше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.63 vs 0.40, $p_{\text{nominal}} = 1.60\text{E-}03$, OR = 2.62, 95% CI: 1.43 – 4.8). Также число носителей данного аллеля было в 1.4 раза значимо больше у больных ПТСП по сравнению со ЗЛ (0.81 vs 0.59, $p_{\text{nominal}} = 0.03$, OR = 2.85, 95% CI: 1.09 – 7.43). Значения p после коррекции по Бонферрони приведены в таблице 3.4.

Интересно, что в зависимости от генотипов полиморфизма rs2736100 гена *TERT* была обнаружена в различие оДТЛ у больных ПТСП, хотя эта разница была не значима. Таким образом, у носителей минорного аллеля полиморфизма rs2736100*Т гена *TERT* оДТЛ была в 1.3 раза короче ($p = 0.3$), по сравнению с гомозиготами по мажорному аллелю (рис. 3.8).

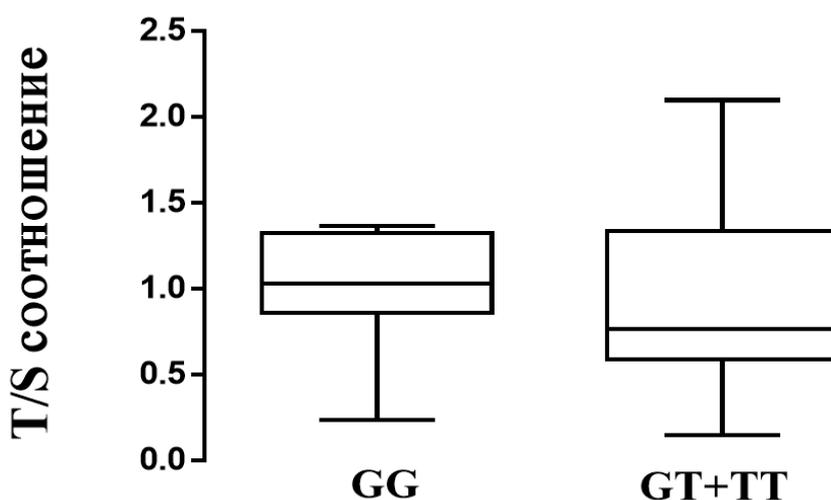


Рисунок 3.8. оДТЛ у больных ПТСП в зависимости от генотипов полиморфизма rs2736100 гена *TERT*.

Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

Далее были рассчитаны ассоциации между полиморфизмами *BCL2* rs956572, rs1801018; *BAX* rs1057369; *ANXA5* rs11575945; *ANXA11* rs1049550; *CPLX2* rs1366116, rs3892909; *BDNF* rs6265; *NTNG1* rs628117; *NGF* rs6330, rs4839435; *NGFR* rs11466155,

rs734194; *CHN1* rs14228, rs2646153; *FOS* rs7101, rs1063169; *JUN* rs11688; и *IER5* rs6425663 и оДТЛ.

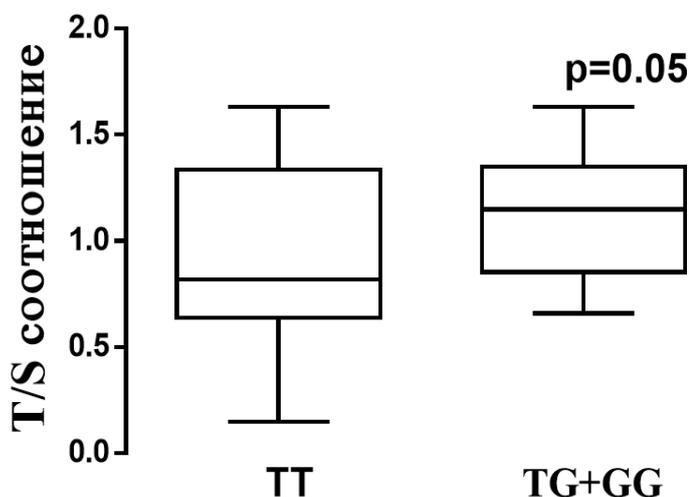


Рисунок 3.9. оДТЛ у больных ПТСП в зависимости от генотипов полиморфизма rs734194 гена *NGFR*.

Данные представлены в виде диаграмм размаха (box-whiskers), где прямоугольники отображают интерквартильные расстояния (размах от 25-го до 75-го перцентиля); вертикальные отрезки вне прямоугольников – размах от 10-го до 90-го перцентиля; медиана представлена горизонтальной линией.

Согласно полученным данным, в зависимости от генотипов полиморфизма rs734194 гена *NGFR* было обнаружено различие в оДТЛ у больных ПТСП, а именно у носителей минорного аллеля данного полиморфизма оДТЛ была в 1.4 раза длиннее, по сравнению с гомозиготами по мажорному аллелю (рис. 3.9). Таким образом, данные результаты подтверждают, что однонуклеотидный полиморфизм гена *NGFR* rs734194 вовлечен в патомеханизм ПТСП, и имеет протективное значение.

3.5. ХАРАКТЕРИСТИКА И РОЛЬ ГЕНОМНЫХ ВАРИАЦИЙ ПРИ ПТСР

С завершением проекта «Генома человека» исследование меж- и внутривнутрипопуляционных генетических вариаций стало представлять наибольший интерес как с точки зрения популяционной генетики, так и персонализированной медицины [The International HapMap Consortium, 2005]. Было выявлено, что примерно 99.9% последовательности ДНК идентично у всех людей, а из оставшихся 0.1% примерно 80% представляют из себя однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) [McVean et al., 2005; Feuk et al., 2006]. В геноме SNP встречаются часто – примерно через каждые 1000 оснований, и могут быть обнаружены как в кодирующих, так и в некодирующих областях генома человека [Zhao et al., 2003]. Во многих исследованиях показана связь минорных аллелей различных SNP с модификацией предрасположенности развития ряда хронических заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера [Brookes & Prince, 2005] и различные виды онкологий [Wang & Armstrong, 2007]. Таким образом, прогнозирование эффектов различных SNP чрезвычайно важно для понимания механизмов развития заболеваний, прогноза их течения и разработки новых терапевтических препаратов.

Однако многие SNP, встречающиеся в интронах или экзонах, являются «молчащими» (нейтральными), поскольку они приводят к заменам в синонимных кодонах и не изменяют аминокислотный состав белка. Показано, что «молчащие» SNP составляют 30 – 45% всех SNP, обнаруженных в экзонных областях человеческого генома [Komar, 2007]. Предполагалось, что эти «молчащие» SNP не оказывают заметного влияния на функцию или фенотип гена. Однако было продемонстрировано обратное, а именно, что данные SNP могут влиять на конформацию и активность белка без изменения уровней мРНК и самого белка [Kimchi-Sarfaty et al., 2007]. Следовательно, возникает необходимость изучения всех SNP при определении вероятности развития различных заболеваний, и для их дальнейшего использования в персонализированных программах лечения и разработки лекарств.

В данной главе приведен анализ и аннотация исследуемых нами геномных вариаций в кодирующих и некодирующих участках с использованием различных общедоступных инструментов и баз данных.

3.5.1. Анализ и аннотация геномных вариаций

Ensembl – научный проект, основной задачей которого является обеспечение специалистов интегрированным доступом к базам данных, касающихся строения геномов более 50 видов позвоночных, включая человека. Проект был запущен в 1999 году перед завершением проекта «Геном человека» [Cunningham et al., 2018]. Ensembl Variant Effect Predictor (VEP) – является набором инструментов для анализа и аннотации геномных вариаций в кодирующих и некодирующих участках [McLaren et al., 2016]. Аннотация SNP – это процесс прогнозирования эффекта или функции отдельного полиморфизма. VEP аннотирует геномные вариации, опираясь на широкую выборку данных базы Ensembl, включая транскрипты, регуляторные области, частоты ранее наблюдавшихся вариаций, клинические данные и предсказания биофизических последствий вариаций. Возможен анализ двух категорий вариаций: малые точно определенные вариации (инсерции, делеции, тандемные повторы, однонуклеотидные полиморфизмы), либо более крупные структурные вариации генома (изменения копийности генов, крупные инсерции или делеции).

С помощью VEP мы провели анализ исследуемых нами полиморфизмов генов *BCL2* rs956572, rs1801018; *BAX* rs1057369; *ANXA5* rs11575945; *ANXA11* rs1049550; *CPLX2* rs1366116, rs3892909; *BDNF* rs6265; *NTNG1* rs628117; *NGF* rs6330, rs4839435; *NGFR* rs11466155, rs734194; *CHN1* rs14228, rs2646153; *FOS* rs7101, rs1063169; *JUN* rs11688; *IER5* rs6425663; *TERC* rs12696304; *TERT* rs7726159 и rs2736100. Все 22 исследуемых нами SNP не являются новыми и были ранее описаны, хотя данные частот вариантов *BAX* rs1057369 и *IER5* rs6425663 по проекту «1000 геномов» в разных популяциях отсутствуют. Сводные статистические данные проведенного нами анализа с помощью VEP приведены на рисунке 3.10.

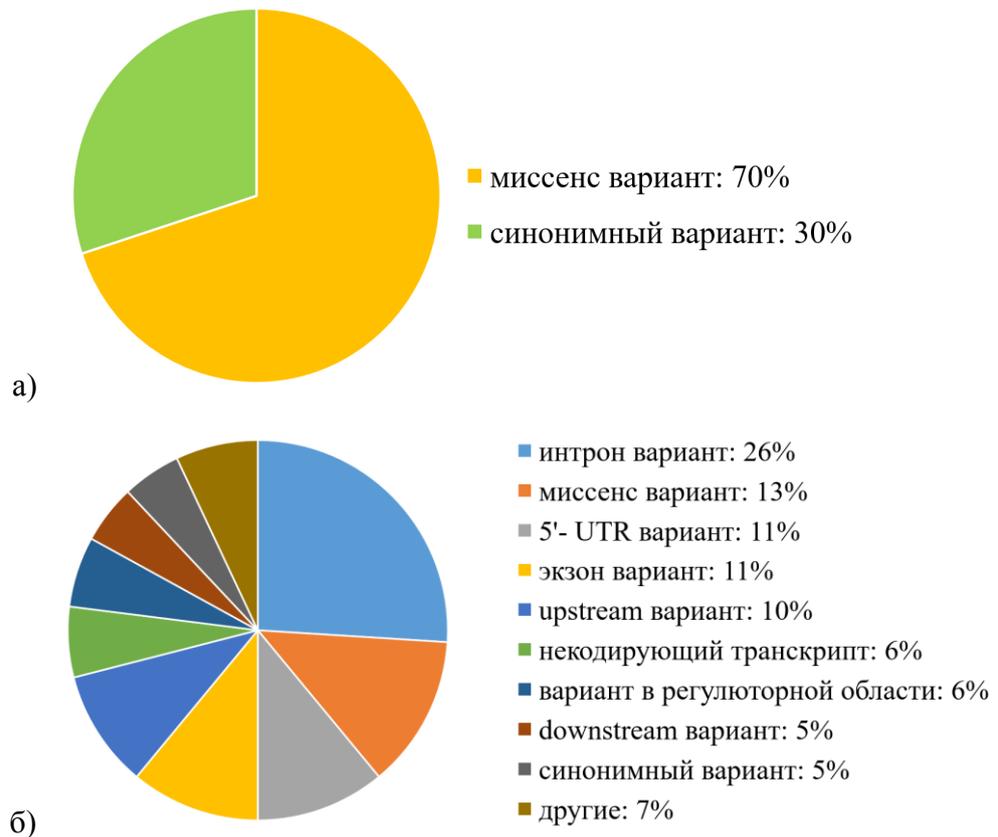


Рисунок 3.10. Сводные статистические данные и диаграммы для представления обзора результатов.

а) тип и **б)** локализация исследуемых вариантов.

Также было проведено сравнение распространенности минорных аллелей исследуемых SNP между армянской популяцией здоровых лиц и других популяций по данным проекта «1000 геномов». Частота распределения минорных аллелей многих полиморфизмов, а именно *BCL2* rs956572, rs1801018; *ANXA11* rs1049550; *BDNF* rs6265; *NTNG1* rs628117; *NGFR* rs11466155; *CHN1* rs14228, rs2646153 и *TERC* rs12696304 совпала с соответствующими данными проекта «1000 геномов» в европейской популяции (табл. 3.5). В случае *ANXA5* rs11575945 полученные нами данные частоты минорного аллеля были схожи с американской, *NGF* rs6330 и rs4839435 – с южноазиатской и африканской популяциями, соответственно, а также *NGFR* rs734194 и *TERT* rs7726159 – с популяцией Восточной Азии, а *TERT* rs2736100 – с южноазиатской популяцией. При этом, для *CPLX2* rs1366116, rs3892909, *FOS* rs7101, rs1063169 и *JUN* rs11688 частота минорной аллели у армян отличалась от всех популяций проекта «1000 геномов» (табл. 3.5).

Таблица 3.5. Частота встречаемости минорного аллеля исследуемых SNP в различных популяциях.

Ген	SNP ID	Аллель	Арм	AF	AFR_AF	AMR_AF	EAS_AF	EUR_AF	SAS_AF	AA_AF	EA_AF
<i>BCL2</i>	rs956572	G	0.59	0.65	0.79	0.60	0.54	0.59	0.68	-	-
	rs1801018	C	0.5	0.24	0.03	0.39	0.09	0.48	0.34	0.09	0.42
<i>BAX</i>	rs1057369	G	0.555	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ANXA5</i>	rs11575945	A	0.15	0.20	0.30	0.15	0.17	0.11	0.24	0.27	0.12
<i>ANXA11</i>	rs1049550	A	0.42	0.39	0.16	0.47	0.64	0.45	0.34	0.20	0.41
<i>CPLX2</i>	rs1366116	T	0.4	0.56	0.30	0.68	0.82	0.59	0.54	-	-
	rs3892909	T	0.53	0.66	0.44	0.74	0.91	0.63	0.67	-	-
<i>BDNF</i>	rs6265	T	0.19	0.20	0.01	0.15	0.49	0.20	0.20	0.04	0.19
<i>NTNG1</i>	rs628117	T	0.55	0.61	0.54	0.64	0.70	0.55	0.67	-	-
<i>NGF</i>	rs6330	A	0.2	0.25	0.16	0.32	0.16	0.46	0.19	0.21	0.45
	rs4839435	A	0.33	0.18	0.37	0.17	0.17	0.03	0.07	-	-
<i>NGFR</i>	rs11466155	T	0.26	0.23	0.05	0.31	0.08	0.32	0.47	0.09	0.33
	rs734194	G	0.27	0.11	0.08	0.07	0.22	0.10	0.06	-	-
<i>CHN1</i>	rs14228	T	0.435	0.38	0.35	0.65	0.29	0.43	0.26	-	-
	rs2646153	A	0.49	0.57	0.79	0.72	0.43	0.48	0.39	-	-
<i>FOS</i>	rs7101	T	0.31	0.71	0.92	0.65	0.57	0.74	0.57	-	-
	rs1063169	T	0.34	0.11	0.01	0.07	0.26	0.15	0.09	-	-
<i>JUN</i>	rs11688	T	0.49	0.09	0.25	0.05	0.02	0.04	0.02	0.20	0.05
<i>IER5</i>	rs6425663	G	0.285	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>TERC</i>	rs12696304	G	0.32	0.47	0.58	0.44	0.68	0.27	0.37	-	-
<i>TERT</i>	rs7726159	T	0.4	0.32	0.17	0.32	0.38	0.35	0.45	-	-
	rs2736100	T	0.4	0.52	0.53	0.57	0.59	0.50	0.39	-	-

* AF – частота варианта по данным проекта «1000 геномов»; AFR_AF – частота варианта по данным проекта «1000 геномов» в африканской популяции; AMR_AF – частота варианта по данным проекта «1000 геномов» в американской популяции; EAS_AF – частота варианта по данным проекта «1000 геномов» в популяции Восточной Азии; EUR_AF – частота варианта по данным проекта «1000 геномов» в европейской популяции; SAS_AF – частота варианта по данным проекта «1000 геномов» в южноазиатской популяции; AA_AF – частота варианта по данным проекта NHLBI-ESP в афроамериканской популяции; EA_AF – частота варианта по данным проекта NHLBI-ESP в американской популяции европейского происхождения.

Таким образом, полученные данные указывают, что распределение минорных аллелей генов, связанных с формированием генетического риска развития ПТСР в Армянской популяции не соответствует популяциям какого-либо одного географического региона. Это, в свою очередь, указывает на нецелесообразность использования в клинической диагностике генетических тестов, разработанных с учетом распределения частот в других популяциях, и подчеркивает важность проведения широкомасштабных исследований генетической вариабельности на популяционном уровне и идентификации генетических маркеров развития комплексных, полигенных заболеваний в Армянской популяции.

3.5.2. Дифференциальный анализ экспрессии генов

Результаты настоящего исследования по генотипированию полиморфизмов в генах *BCL2*, *BAX*, *ANXA5*, *ANXA11*, *CPLX2*, *NTNG1*, *BDNF*, *NGF*, *NGFR*, *CHN1*, *FOS*, *JUN*, *IER5*, *TERT* и *TERC* выявили ассоциацию полиморфизмов *BCL2* rs956572, rs1801018; *BAX* rs1057369; *ANXA11* rs1049550; *CPLX2* rs1366116; *BDNF* rs6265; *NGF* rs6330, rs4839435; *NGFR* rs734194; *FOS* rs7101, rs1063169 и *TERT* rs2736100 с риском развития ПТСР. Однако, необходимо учесть, что конечный фенотип заболевания, в целом, связан не только с генетическими вариациями, но и с функциональной реализацией генетической информации на уровне экспрессии генов. Поэтому, был проведен дифференциальный анализ экспрессии генов, полиморфизмы которых были связаны с риском развития ПТСР. Для проведения данного исследования были использованы общедоступные наборы данных по экспрессии генов, депонированные в репозитории Gene Expression Omnibus [Barrett et al., 2013].

Поиск в базе данных выявил 4 набора данных глобальной экспрессии генов, полученных методом микрочипов. Дифференциальный анализ генов был проведен с использованием статистической модели “limma” (Linear Models for Microarray Data) [Smyth, 2005], реализованной в программе GEO2R [Barrett et al., 2013].

Набор данных GSE67663 [Wingo et al., 2015] содержит профили экспрессии 13049 генов в клетках периферической крови 184 лиц, из которых 72 служили контрольной

группой, а остальные 112 страдали ПТСР и депрессией. Анализ дифференциальной экспрессии генов показал повышенную экспрессию гена *BCL2* ($p = 0.05$) у больных ПТСР и депрессией по сравнению с контрольной группой (табл. 3.6).

Следующий набор данных – GSE77164 содержит профили транскрипции периферической крови у несовершеннолетних, активно участвующих в боевых действиях во время Непальской народной войны (детей-солдат) и детей-некомбатантов [Kohrt et al., 2016]. В дополнение к базовым демографическим характеристикам (возраст, пол, статус этнических меньшинств, уровень образования), участников также оценивали на наличие ПТСР. Всего набор данных содержал профили экспрессии клеток периферической крови у 254 лиц. Проведенный нами анализ экспрессии генов данного набора данных также показал повышенную ($p = 0.03$) экспрессию гена *BCL2* у детей-солдат больных ПТСР по сравнению с контрольной группой (табл. 3.6).

Набор данных GSE860 включает сведения экспрессии генов мононуклеарных клеток периферической крови, используя олигонуклеотидные микрочипы ($N = 33$) [Segman et al., 2003]. Субъектами данного исследования были жертвы травм, которые были приняты в отделение неотложной помощи сразу же после травматического события и которые либо соответствовали диагностическим критериям DSM-IV острого и хронического ПТСР спустя 1 и 4 месяцев наблюдения ($N = 17$), либо не страдали ПТСР ($N = 16$) в тот момент времени. После количественного определения и нормализации сигнала авторами был идентифицирован набор из 4512 активных транскриптов, из которых 656 дифференциально выражены между больными ПТСР и контрольными образцами. Проведенный нами анализ дифференциальной экспрессии в этом наборе данных выявил повышенную экспрессию генов *BAX* и *BCL2* (соответственно, $p = 0.03$ и 0.01) у больных ПТСР по сравнению с контрольной группой. Кроме того, у больных ПТСР по сравнению с контрольной группой обнаружена повышенная экспрессия генов *CPLX2* ($p = 0.02$), *BDNF* ($p = 0.03$) и *NGF* ($p = 0.01$).

Наборы данных GSE64813 [Breen et al., 2015] и GSE97356 [Kuan et al., 2017] содержат данные по экспрессии транскриптома, полученные с использованием секвенирования РНК (RNA-Seq). Для дифференциального анализа экспрессии в этих наборах был использован программный пакет DESeq2 [Love et al., 2014].

Объектами исследования в наборе данных GSE64813 [Breen et al., 2015] являлись лейкоциты периферической крови лиц, служивших в морской пехоте США (N = 188), собранные как до, так и после пребывания в зонах конфликтов. По возвращению, у половины исследуемых субъектов было диагностировано ПТСР, другая половина – служила контрольной группой. Анализ GSE64813 набора данных не выявил достоверной ассоциации экспрессии исследуемых нами генов и ПТСР.

Следующий набор данных – GSE97356 включает данные исследования экспрессии транскриптома с использованием секвенирования РНК цельной крови 324 образцов, из них 201 не страдали ПТСР, 81 больной ПТСР, а 42 страдали ПТСР в прошлом. В целом было обнаружено 448 дифференциально экспрессированных генов. Анализ экспрессии генов данного набора данных, в отличие от предыдущих, а также полученных нами результатов, показал пониженную ($p = 0.02$) экспрессию гена *BAX* у больных ПТСР по сравнению с контрольной группой (табл. 3.6).

Таблица 3.6. Значения дифференциально выраженных генов.

Набор данных	Ген	logFC	AveExpr	t	P.Value
GSE67663	<i>BCL2</i>	0.02	2.98	1.96	0.05
GSE77164	<i>BCL2</i>	0.05	6.75	2.14	0.03
GSE860	<i>BAX</i>	0.23	8.25	2.22	0.03
	<i>BCL2</i>	0.27	9.68	3.00	0.01
	<i>CPLX2</i>	0.22	8.97	2.42	0.02
	<i>BDNF</i>	0.43	6.01	2.27	0.03
	<i>NGF</i>	0.43	9.04	2.81	0.01
GSE97356	<i>BAX</i>	-0.13	6.3	2.31	0.02

* logFC – логарифм кратного изменения значений экспрессии; AveExpr – среднее значение экспрессии; t – Т статистика, значение которого рассчитывается как $t = \logFC/SE$.

Таким образом дифференциальный анализ экспрессии генов выявил повышенную экспрессию гена *BCL2* (наборы данных GSE67663, GSE77164 и GSE860), а также гена *BAX* (набор данных GSE860) у больных ПТСР по сравнению с контрольной группой, что совпадает с полученными нами данными по повышенным уровням белков кодируемых соответствующими генами. Однако в наборе данных GSE97356, мы наоборот выявили пониженную экспрессию гена *BAX* у больных по сравнению с контрольной группой. Кроме того, проведенный нами анализ выявил повышенную экспрессию генов *BDNF*, *NGF* и *CPLX2*, что противоречит результатам нашего исследования, которые показали пониженный уровень белка комплексина 2 у больных ПТСР по сравнению со здоровыми лицами.

Проведенный нами анализ показал, что у больных ПТСР, у которых развитие болезни ассоциировано с различными видами травм, наблюдаются как общие, так и отличные паттерны дерегуляции экспрессии генов.

На сегодняшний день неизвестно влияет ли характер травмы на глобальную экспрессию генов, однако последние результаты указывают о такой возможности [Huckins et al., 2009]. С другой стороны дифференциальный анализ экспрессии генов общедоступных наборов данных выявил повышенную экспрессию гена *BCL2* независимо от популяционных различий, а так же типа травматического события, тем самым показывая ключевую роль данного гена в качестве фактора риска развития ПТСР.

3.5.3. Анализ сети взаимодействия исследуемых генов/белков

Полученные нами результаты по ассоциации полиморфизмов генов, связанных с апоптозом, нейрональной пластичностью, а также укороченной длиной теломер при ПТСР указывают на возможную связь между нарушениями связанными с нейроструктурными изменениями и признаками ускоренного старения при этом заболевании. Результаты этих исследований можно обобщить с использованием методов системной биологии.

Системная биология является незаменимым подходом для изучения комплексных заболеваний или расстройств. Хотя на данный момент накоплено большое количество данных геномики и протеомики, тем не менее, детальные молекулярные механизмы

некоторых неврологических расстройств до сих пор не изучены [Hasegawa et al., 2010], что существенно затрудняет разработку объективных молекулярных диагностических тестов.

Модели сетей, включающие данные белок-белковых взаимодействий (ББВ), являются относительно новым способом изучения генов, связанных с заболеваниями. Тем не менее, этот подход уже доказал свою эффективность для выявления генов, вовлеченных в патомеханизм комплексных заболеваний [Gaire et al., 2013]. Таким образом, анализ функциональных сетей генов обеспечивает основу для приоритизации кандидатных генов и может способствовать выявлению ключевых клеточных путей которые могут служить в качестве терапевтических мишеней.

Белки определенной функциональной категории, объединенные в кластеры, в одних и тех же сетях ББВ, называются функциональными модулями, и локализация белков в сетях ББВ может использоваться для прогнозирования функций белка [Makino & Gojobori, 2006]. Понимание сетей ББВ можно использовать для предсказания дополнительных генов, мутации в которых могут вызывать то же заболевание, что и мутации в взаимодействующих друг с другом генах [Gilman et al., 2011], а также объясняют, почему так много разных генетических мутаций могут быть ассоциированы с одним и тем же комплексным заболеванием [Aziz et al., 2012]. В целом сети ББВ имеют решающее значение для разработки проверяемых гипотез относительно основных патогенных механизмов многих комплексных генетических нарушений.

Чтобы лучше визуализировать функциональные взаимодействия ББВ на сетевом уровне, между исследуемыми нами генами *BCL2*, *BAX*, *ANXA5*, *ANXA11*, *CPLX2*, *NTNG1*, *BDNF*, *NGF*, *NGFR*, *CHN1*, *FOS*, *JUN*, *IER5*, *TERT* и *TERC*, мы использовали общедоступную базу данных STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) [Szklarczyk et al., 2013] (рис. 3.11).

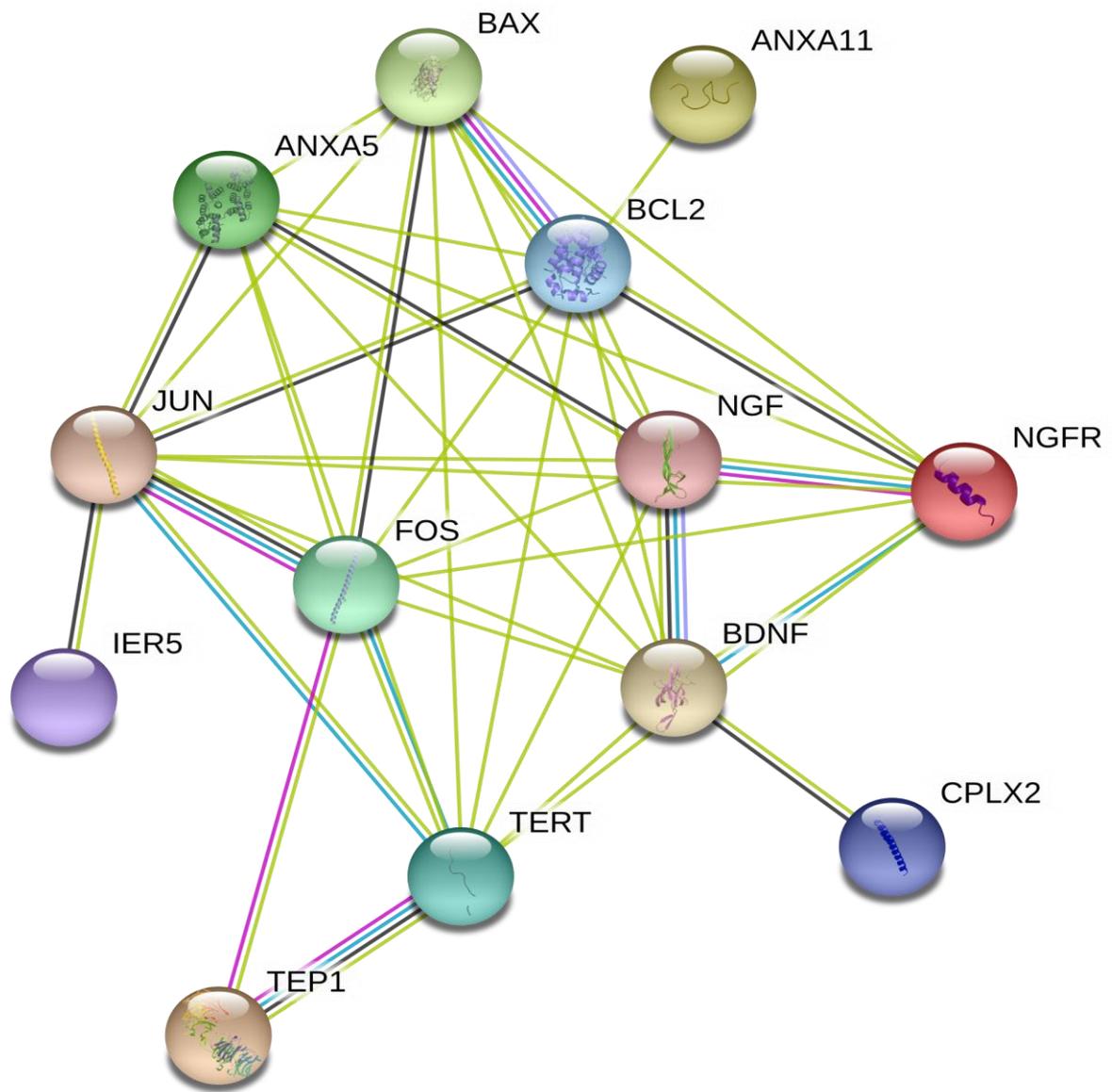


Рисунок 3.11. Визуализация прогнозируемой сети белок-белковых взаимодействий (ББВ) с помощью STRING. Узлы сети являются белками. Линии представляют собой предсказанные функциональные ассоциации ББВ. Известные взаимодействия: из курируемых баз данных; экспериментально выявленные. Предсказанные взаимодействия: близость генов в геноме (gene neighborhood); генные слияния; совместное нахождение генов (gene co-occurrence); Другие: интеллектуальный анализ текста (text mining); ко-экспрессия; гомология белка

Сетевой анализ генов-кандидатов, основанный на известных и предсказанных ББВ, дополнительно показал, что белки, кодируемые генами, полиморфизмы которых были ассоциированы с ПТСП, и которые регулируют процессы синаптической пластичности, апоптоза и ускоренного старения являются частью одной белковой сети, что является еще

одним подтверждением их вовлечения в патогенез ПТСР. Таким образом, полученные нами данные способствуют обогащению текущих представлений о молекулярных механизмах, лежащих в основе патофизиологии ПТСР, и позволяют предложить гены-кандидаты для последующих функциональных исследований, что, в свою очередь может стимулировать дальнейшую разработку методов дифференциальной диагностики и лечения ПТСР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ПТСР – это комплексное, хроническое психическое заболевание, относящееся к группе тревожных расстройств, которое может негативно влиять на качество жизни, физическое здоровье и когнитивные способности человека [Andreescu & Varon, 2015]. Прогрессирующий рост заболеваемости ПТСР за последние годы вызвал большой интерес специалистов к этой еще недостаточно изученной нозологии. Разработка научно обоснованных методов профилактики, коррекции и лечения ПТСР является одной из насущных социально-экономических проблем, однако прогресс в данном направлении лимитирован отсутствием четких представлений о молекулярных механизмах развития болезни.

Результаты проведенных исследований показали, что у людей с тревожными расстройствами ухудшение физического здоровья или когнитивных функций может отчасти быть результатом ускоренного клеточного старения и нейропрогрессии [Perna et al., 2016]. Нейропрогрессия – это патологическая перестройка ЦНС, сопровождающаяся тяжелыми психическими расстройствами, приводящими к структурным и функциональным изменениям головного мозга. Это – сочетание повышенной нейродегенерации, нейронального апоптоза или нейротоксической восприимчивости и пониженной нейропластичности [Berk et al., 2011]. Нейропластичность относится к способности мозга изменяться в ответ на требования окружающей среды и играет важную роль в оптимизации работы мозга. Последняя охватывает нейрогенез, структурную и функциональную перестройку мозга, клеточные и молекулярные изменения и когнитивную пластичность. Эти процессы происходят на протяжении всей жизни в ответ на широкий спектр генетических и средовых факторов [Greenwood & Parasuraman, 2010]. Следует также добавить, что нейропластичность подавляется с возрастом, и ее нарушение может отрицательно влиять на процессы старения и когнитивные способности [Riddle & Lichtenwalner, 2007].

Нейрогенез – это образование, рост и развитие новых нейронов из нервных стволовых клеток и клеток-предшественников, ограниченный у взрослых барьерной функцией гиппокампа – субгранулярной и субвентрикулярной зоны зубчатой извилины

[Ernst et al., 2014]. Нарушение нейрогенеза гиппокампа исследовано на животных моделях тревожных расстройств. Установлено, что расстройство данного процесса может быть связано с тревогой, однако все еще открытым остается вопрос о том, обусловлено ли стрессом ускоренное ухудшение нейрогенеза гиппокампа у людей [Varela-Nallar et al., 2010; Miller & Hen, 2015].

В исследованиях на животных моделях старение ассоциировалось со значительным снижением нейрогенеза гиппокампа у грызунов [Olariu et al., 2007], собак [Siwak-Tapp et al., 2007] и мартышек [Leuner et al., 2007]. Несколько исследований показало, что нейрогенез гиппокампа у крыс уменьшается на 80% примерно к одному-двум годам [Kuhn et al., 1996; Heine et al., 2004]. Известно, у людей образование новых нейронов широко распространено в младенчестве и подростковом возрасте и резко снижается в зрелом возрасте и особенно в старчестве [Perna et al., 2016]. Хотя пониженный нейрогенез может оказывать важные защитные эффекты, такие как профилактика опухолей [Hamilton et al., 2013], он также связан с нарушением синаптической пластичности у мышей [Burghardt et al., 2012] и возрастным дефицитом когнитивных функций у людей [Lazarov & Demars, 2012]. Таким образом, стресс может быть связан с подавлением нейрогенеза, подобно тому, что наблюдается при старении.

Механизмы, приводящие к развитию вышеупомянутых деструктивных процессов на уровне апоптоза и синаптической пластичности, представляют особый интерес при изучении ПТСР. В настоящее время, однако, молекулярно-генетические механизмы, задействованные при развитии этих процессов, недостаточно изучены, а существующие данные немногочисленных исследований представляются недостаточно убедительными [Pape & Pape, 2010; Mahan & Ressler, 2012; Li et al., 2013].

Известно, что важнейшими регуляторами апоптоза являются проапоптотический белок Вах и антиапоптотический белок Bcl-2; кроме того, соотношение Вах/Bcl-2, а также концентрации белков аннексин-A5 и аннексин-A11 являются решающими индикаторами данного процесса. До настоящего времени опубликовано лишь ограниченное число исследований о молекулярных мишенях, вовлеченных в процесс апоптоза, и их потенциальном вкладе в этиологию ПТСР; более того, эти работы проведены лишь на животных моделях [Li et al., 2010a; Kung et al., 2010; Li et al., 2013; Hoffman et al., 2014].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что для патогенеза ПТСР характерен пониженный уровень апоптоза, что совпадает с нашими предыдущими результатами о наличии вялотекущего воспалительного процесса у больных данной патологией [Оганесян и др., 2012]. Это заключение основано на следующих результатах: в крови больных ПТСР, по сравнению с нормой, регистрируется низкое соотношение белков Вах/Vcl-2 и низкое содержание белка аннексина-A5. Кроме того, показано, что данные нарушения могут быть генетически обусловленными, а именно, функциональные однонуклеотидные полиморфизмы генов, вовлеченных в процесс апоптоза (rs956572 и rs1801018 гена *BCL2*, rs1057369 гена *BAX*, rs1049550 гена *ANXA11*), ассоциированы с риском развития ПТСР.

Важнейшими регуляторами синаптической и морфологической пластичности нейронов являются белки комплексин 2, нетрин G1, нейротрофический фактор мозга, фактор роста нервов и его рецептор, а также химерин 1; ключевыми транскрипционными факторами этих процессов являются c-Fos, IER5 и c-Jun.

Обнаружено, что гены, вовлеченные в процессы синаптической пластичности, ассоциированы как с высоким (полиморфизмы rs1366116 гена *CPLX2*, rs6330 гена *NGF*), так и с пониженным (rs6265 гена *BDNF*, rs4839435 гена *NGF*, rs734194 гена *NGFR*) риском развития ПТСР. Установлено также, что функциональные однонуклеотидные полиморфизмы rs7101 и rs1063169 гена *FOS* модулируют риск развития ПТСР. Показано, что патогенез ПТСР характеризуется нарушением процесса синаптической пластичности, что проявляется в снижении в периферической крови уровня белка комплексина 2.

При исследовании армянской популяции выявлен также ряд функциональных однонуклеотидных полиморфизмов генов, вовлеченных в процессы апоптоза, синаптической пластичности и ускоренного старения, ассоциированных как с высоким, так и с пониженным риском развития ПТСР. Эти результаты обобщенно представлены на рисунке 3.12.

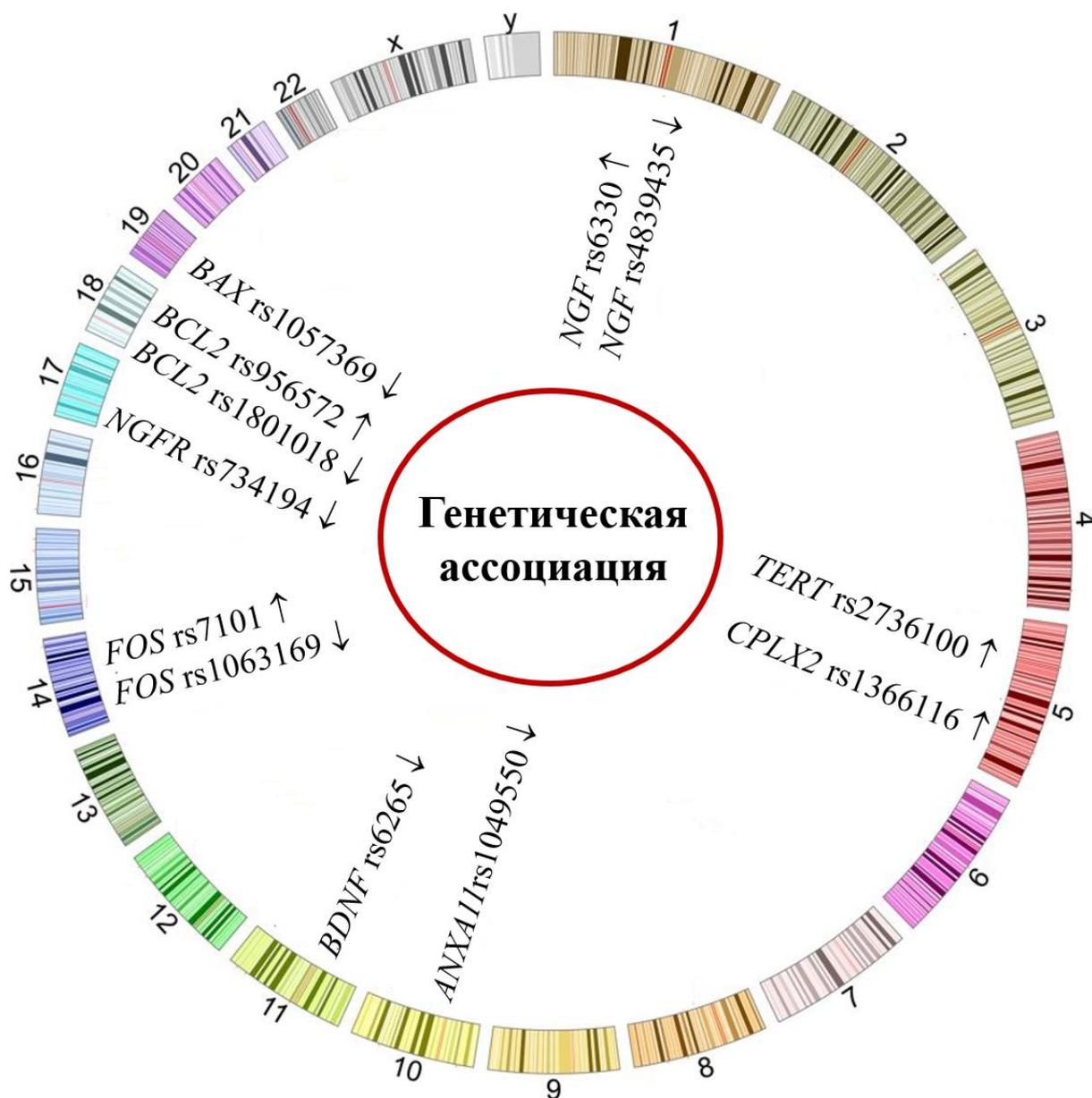


Рисунок 3.12. Однонуклеотидные полиморфизмы генов (кодирующих маркеры апоптоза, синаптической пластичности и ускоренного старения), ассоциированные с риском развития ПТСР.

Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют прояснить ряд вопросов, связанных с процессами, которые приводят к дисфункции апоптоза и синаптической пластичности при ПТСР, и существенно обогащают современные представления о молекулярно-генетических факторах развития данной патологии.

ВЫВОДЫ

1. Полиморфизмы генов, вовлеченных в процесс апоптоза (полиморфизм rs956572 и rs1801018 гена *BCL2*, rs1057369 гена *BAX*, rs1049550 гена *ANXA11*), ассоциированы с риском развития посттравматического стрессового расстройства.
2. Гены, вовлеченные в процесс синаптической пластичности, ассоциированы как с высоким (полиморфизмы rs1366116 гена *CPLX2*, rs6330 гена *NGF*), так и с пониженным (rs6265 гена *BDNF*, rs4839435 гена *NGF*, rs734194 гена *NGFR*) риском развития посттравматического стрессового расстройства.
3. Полиморфизмы rs7101 и rs1063169 гена *FOS* модулируют риск развития посттравматического стрессового расстройства.
4. Пониженное соотношение *Bax/Bcl-2*, а также снижение содержания белков аннексина-A5 и комплексина 2 в периферической крови больных свидетельствуют о нарушении процессов апоптоза и синаптической пластичности при посттравматическом стрессовом расстройстве.
5. Патогенез посттравматического стрессового расстройства ассоциирован с укорочением относительной длины теломер в лейкоцитах больных.
6. Носители минорного аллеля локуса rs734194 гена *NGFR* обладают относительно длинными теломерами, что указывает на протекторную роль данного полиморфизма при посттравматическом стрессовом расстройстве.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волошин В.М. Типология хронического посттравматического стрессового расстройства. // Ж. Невр. и псих. им. С.С. Корсакова. 2004; 104(1):17-23.
2. Оганесян Л.П., Мкртчян Г.М., Бояджян А.С., Аветян Д.Г., Тадевосян М.Я., Сукиасян С.Г. Маркеры воспаления при посттравматическом стрессовом расстройстве. // Цитокины и воспаление. 2012; 11(1):42-45.
3. Петрищев Н.Н., Васина Л.В., Луговая А.В. Содержание растворимых маркеров апоптоза и циркулирующих аннексин V-связанных апоптотических клеток в крови больных острым коронарным синдромом. // Вестник Санкт-Петер. Универс. 2008; 11(1):14-23.
4. Тарабрина Н.В. Практикум по психологии посттравматического стресса. // Спб: Питер, 2001; с. 272.
5. Abrams T.E., Blevins A., Weg M.W. Chronic obstructive lung disease and posttraumatic stress disorder: current perspectives. // Int J Chron Obstruct Pulmon Dis. 2015; 10:2219-2233. doi: 10.2147/COPD.S71449.
6. Alani B. , Maghsoudi N. , Khatibi A. , Noureddini M. , Asefifar F. , Shams J. Study of the variations in apoptotic factors in hippocampus of male rats with posttraumatic stress disorder. // Adv Biomed Res. 2013; 2:42. doi: 10.4103/2277-9175.109757.
7. Alberini C.M. Transcription factors in longterm memory and synaptic plasticity. // Physiol Rev. 2009; 89(1):121-145. doi: 10.1152/physrev.00017.2008.
8. Almlı L.M., Fani N., Smith A.K., Ressler K.J. Genetic approaches to understanding post-traumatic stress disorder. // Int J Neuropsychopharmacol. 2014; 17(2):355-70. doi: 10.1017/S1461145713001090.
9. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Fifth Edition. Washington, DC: 2013.
10. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Third Edition. Washington, DC: 1980.
11. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Third Edition-Revised. Washington. DC: 1987.

12. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth Edition. Washington, DC: 1994.
13. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. Fourth Edition-Revised. Washington, DC: 2000.
14. Amstadter A.B. Invited commentary on patho-genetics of post-traumatic stress disorder. // *Psychiatr Danub.* 2012; 24:276–277.
15. Amstadter A.B., Nugent N.R., Koenen K.C. Genetics of PTSD: fear conditioning as a model for future research. // *Psychiatr Ann.* 2009; 39:358–367.
16. Amstadter A.B., Nugent N.R., Yang B.Z., Miller A., Sibirian R., Moorjani P., Haddad S., Basu A., Fagerness J., Saxe G., Smoller J.W., Koenen K.C. Corticotrophin-releasing hormone type 1 receptor gene (CRHR1) variants predict post-traumatic stress disorder onset and course in pediatric injury patients. // *Dis Markers.* 2011; 30:89–99.
17. Andero R., Ressler K.J. Fear extinction and BDNF: translating animal models of PTSD to the clinic. // *Genes Brain Behav.* 2012; 11(5):503-12. doi: 10.1111/j.1601-183X.2012.00801.x.
18. Andreescu C., Varon D. New research on anxiety disorders in the elderly and an update on evidence-based treatments. // *Current Psychiatry Reports.* 2015; 17(7):53. doi: 10.1007/s11920-015-0595-8.
19. Anger W.K., Storzbach D., Binder L.M., Campbell K.A., Rohlman D.S., McCauley L., Kovera C.A., Davis K.L. Neurobehavioral deficits in Persian Gulf veterans: evidence from a population-based study. Portland Environmental Hazards Research Center. // *J Int Neuropsychol Soc.* 1999; 5(3):203–212.
20. Auxéméry Y. Post-traumatic psychiatric disorders: PTSD is not the only diagnosis. // *Presse Med.* 2018; 47(5):423-430. doi: 10.1016/j.lpm.2017.12.006.
21. Aziz A., Ilievska J., Fisher P., Bishop N. Chapter 1. An Evolutionary Biology Approach to Understanding Neurological Disorders. // In: *Protein Structure* (Editor: E. Faraggi), IntechOpen, EU, 2012, pp. 1-42. doi: 10.5772/37919.
22. Bachmann A.W., Sedgley T.L., Jackson R.V., Gibson J.N., Young R.M., Torpy D.J. Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. // *Psychoneuroendocrinology.* 2005; 30(3):297-306.

23. Barrett T., Wilhite S.E., Ledoux P., Evangelista C., Kim I.F., Tomashevsky M., Marshall K.A., Phillippy K.H., Sherman P.M., Holko M., Yefanov A., Lee H., Zhang N., Robertson C.L., Serova N., Davis S., Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets-update. // *Nucleic Acids Res.* 2013; 41:D991-D995. doi: 10.1093/nar/gks1193
24. Bekaert S., Derradji H., Baatout S. Telomere biology in mammalian germ cells and during development. // *Dev. Biol.* 2004; 274:15–30. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.06.023>
25. Benes F.M. Amygdalocortical circuitry in schizophrenia: from circuits to molecules. // *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35(1):239-57. doi: 10.1038/npp.2009.116.
26. Berk M., Kapczinski F., Andreazza A.C., Dean O.M., Giorlando F., Maes M., Yücel M., Gama C.S., Dodd S., Dean B., Magalhães P.V., Amminger P., McGorry P., Malhi G.S. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. // *Neurosci Biobehav Rev.* 2011; 35(3):804-17. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.001.
27. Binder E.B., Bradley R.G., Liu W., Epstein M.P., Deveau T.C., Mercer K.B., Tang Y., Gillespie C.F., Heim C.M., Nemeroff C.B., Schwartz A.C., Cubells J.F., Ressler K.J. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. // *JAMA.* 2008; 299(11):1291-1305. doi: 10.1001/jama.299.11.1291.
28. Blake D.D., Weathers F.W., Nagy L.M., Kaloupek D.G., Gusman F.D., Charney D.S., Keane T.M. The development of a clinician-administered PTSD scale. // *J Trauma Stress.* 1995; 8(1):75-90.
29. Bomyea J., Risbrough V., Lang A.J. A consideration of select pre-trauma factors as key vulnerabilities in PTSD. // *Clin Psychol Rev.* 2012; 32:630–641.
30. Breen M.S., Maihofer A.X., Glatt S.J., Tylee D.S., Chandler S.D., Tsuang M.T., Risbrough V.B., Baker D.G., O'Connor D.T., Nievergelt C.M., Woelk C.H. Gene networks specific for innate immunity define post-traumatic stress disorder. // *Mol Psychiatry.* 2015; 20(12):1538-1545. doi: 10.1038/mp.2015.9.
31. Broekman B.F., Olf M., Boer F. The genetic background to PTSD. // *Neurosci Biobehav Rev.* 2007; 31:348–362.

32. Brookes A.J., Prince J.A. Genetic association analysis: lessons from the study of Alzheimer's disease. // *Mutat. Res.* 2005; 573(1–2):152–159.
33. Brose N. Altered complexin expression in psychiatric and neurological disorders: cause or consequence? // *Mol Cells.* 2008; 25(1):7-19.
34. Bunce M., O'Neill C.M., Barnardo M.C., Krausa P., Browning M.J., Morris P.J., Welsh K.I., 1995. Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP)/ *Tissue Antigens*, v. 46, №5: 355-67.
35. Burghardt N.S., Park E.H., Hen R., Fenton A.A. Adult-born hippocampal neurons promote cognitive flexibility in mice. // *Hippocampus.* 2012; 22(9):1795-1808. doi: 10.1002/hipo.22013.
36. Capurro A., Bodea L.G., Schaefer P., Luthi-Carter R., Perreau V.M. Computational deconvolution of genome wide expression data from Parkinson's and Huntington's disease brain tissues using population-specific expression analysis. // *Front Neurosci.* 2015; 8:441. doi: 10.3389/fnins.2014.00441.
37. Caspi A., Sugden K., Moffitt T.E., Taylor A., Craig I.W., Harrington H., McClay J., Mill J., Martin J., Braithwaite A., Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. // *Science.* 2003; 301:386–389.
38. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(3):e21. doi: 10.1093/nar/gkn1027
39. Chan S.R.W.L., Blackburn E.H. Telomeres and telomerase. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2004; 359:109–21. doi: 10.1098/rstb.2003.1370.
40. Chang S.C., Xie P., Anton R.F., De Vivo I., Farrer L.A., Kranzler H.R., Oslin D., Purcell S.M., Roberts A.L., Smoller J.W., Uddin M., Gelernter J., Koenen K.C. No association between ADCYAP1R1 and post-traumatic stress disorder in two independent samples. // *Mol Psychiatry.* 2012; 17:239–241.
41. Chang W.K., Yang K.D., Chuang H., Jan J.T., Shaio M.F. Glutamine protects activated human T cells from apoptosis by up-regulating glutathione and Bcl-2 levels. // *Clin Immunol.* 2002; 104(2):151–160.

42. Chao D.T., Korsmeyer S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. // *Annu Rev Immunol.* 1998; 16:395–419.
43. Chen R., Valencia I., Zhong F., McColl K.S., Roderick H.L., Bootman M.D., Berridge M.J., Conway S.J., Holmes A.B., Mignery G.A., Velez P., Distelhorst C.W. Bcl-2 functionally interacts with inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to regulate calcium release from the ER in response to inositol 1,4,5-trisphosphate. // *J Cell Biol.* 2004; 166(2):193–203.
44. Chhatwal J.P., Stanek-Rattiner L., Davis M., Ressler K.J. Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction. // *Nat Neurosci.* 2006; 9:870–872.
45. Codd V., Mangino M., van der Harst P., Braund P.S., Kaiser M., Beveridge A.J., Rafelt S., Moore J., Nelson C., Soranzo N., Zhai G., Valdes A.M., Blackburn H., Leach I.M., de Boer R.A., Kimura M., Aviv A., Goodall A.H., Ouwehand W., van Veldhuisen D.J., van Gilst W.H., Navis G., Burton P.R., Tobin M.D., Hall A.S., Thompson J.R., Spector T., Samani N.J., Samani N.J. Common variants near TERC are associated with mean telomere length. // *Nat. Genet.* 2010; 42:197–199. doi: 10.1038/ng.532.
46. Codd V., Nelson C.P., Albrecht E., Mangino M., Deelen J., Buxton J.L., Hottenga J.J., Fischer K., Esko T., Surakka I., Broer L., Nyholt D.R., Leach I.M., Salo P., Hägg S., Matthews M.K., Palmen J., Norata G.D., O'Reilly P.F., Saleheen D., Amin N., Balmforth A.J., Beekman M., de Boer R.A., Böhringer S., Braund P.S., Burton P.R., Craen A.J.M., Denniff M., Dong Y., Douroudis K., Dubinina E., Eriksson J.G., Garlaschelli K., Guo D., Hartikainen A.-L., Henders A.K., Houwing-Duistermaat J.J., Kananen L., Karsen L.C., Kettunen J., Klopp N., Lagou V., van Leeuwen E.M., Madden P.A., Mägi R., Magnusson P.K.E., Männistö S., McCarthy M.I., Medland S.E., Mihailov E., Montgomery G.W., Oostra B.A., Palotie A., Peters A., Pollard H., Pouta A., Prokopenko I., Ripatti S., Salomaa V., Suchiman H.E.D., Valdes A.M., Verweij N., Viñuela A., Wang X., Wichmann H.E., Widen E., Willemsen G., Wright M.J., Xia K., Xiao X., van Veldhuisen D.J., Catapano A.L., Tobin M.D., Hall A.S., Blakemore A.I.F., van Gilst W.H., Zhu H., Erdmann J., Reilly M.P., Kathiresan S., Schunkert H., Talmud P.J., Pedersen N.L., Perola M., Ouwehand W., Kaprio J., Martin N.G., van Duijn C.M., Hovatta I., Gieger C., Metspalu

- A., Boomsma D.I., Jarvelin M.-R., Slagboom P.E., Thompson J.R., Spector T.D., van der Harst P., Samani N.J., Samani N.J. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. // *Nat. Genet.* 2013; 45:422–427. doi: 10.1038/ng.2528.
47. Cohen R.M., Small C., Lalonde F. Effect of apolipoprotein E genotype on hippocampal volume loss in aging healthy women. // *Neurology.* 2001; 57:2223–2228.
48. Cooper G.M. Regulation of Transcription in Eukaryotes. // In: *The Cell: A Molecular Approach.* 2nd edition, Sinauer Associates Inc., USA, 2000, pp. 689. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9904/>
49. Cornelis M.C., Nugent N.R., Amstadter A.B., Koenen K.C. Genetics of post-traumatic stress disorder: review and recommendations for genome-wide association studies. // *Curr Psychiatry Rep.* 2010; 12:313–326.
50. Cunningham F., Achuthan P., Akanni W., Allen J., Amode M.R., Armean I.M., Bennett R., Bhai J., Billis K., Boddu S., Cummins C., Davidson C., Dodiya K.J., Gall A., Girón C.G., Gil L., Grego T., Haggerty L., Haskell E., Hourlier T., Izuogu O.G., Janacek S.H., Juettemann T., Kay M., Laird M.R., Lavidas I., Liu Z., Loveland J.E., Marugán J.C., Maurel T., McMahon A.C., Moore B., Morales J., Mudge J.M., Nuhn M., Ogeh D., Parker A., Parton A., Patricio M., Abdul Salam A.I., Schmitt B.M., Schuilenburg H., Sheppard D., Sparrow H., Stapleton E., Szuba M., Taylor K., Threadgold G., Thormann A., Vullo A., Walts B., Winterbottom A., Zadissa A., Chakiachvili M., Frankish A., Hunt S.E., Kostadima M., Langridge N., Martin F.J., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Staines D.M., Trevanion S.J., Aken B.L., Yates A.D., Zerbino D.R., Flicek P. Ensembl 2019. // *Nucleic Acids Res.* 2018. doi: 10.1093/nar/gky1113.
51. Damjanovic A.K., Yang Y., Glaser R., Kiecolt-Glaser J.K., Nguyen H., Laskowski B., Zou Y., Beversdorf D.Q., Weng N. Accelerated telomere erosion is associated with a declining immune function of caregivers of Alzheimer’s disease patients. // *J. Immunol.* 2007; 179:4249–4254.
52. Davis M.C., Zautra A.J., Younger J., Motivala S.J., Attrep J., Irwin M.R. Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: Implications for fatigue. // *Brain Behav Immun.* 2008; 22(1):24–32.

53. Dhabhar F.S., McEwen B.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. // *Brain Behav Immun.* 1997; 11(4):286-306.
54. Digangi J., Guffanti G., McLaughlin K.A., Koenen K.C. Considering trauma exposure in the context of genetics studies of post-traumatic stress disorder: a systematic review. // *Biol Mood Anxiety Disord.* 2013; 3:2. doi: 10.1186/2045-5380-3-2
55. DiProspero N.A., Chen E.Y., Charles V., Plomann M., Kordower J.H., Tagle D.A. Early changes in Huntington's disease patient brains involve alterations in cytoskeletal and synaptic elements. // *J Neurocytol.* 2004; 33(5):517-533.
56. Domschke K. Patho-genetics of post-traumatic stress disorder. // *Psychiatria Danubina.* 2012; 24:267–273.
57. D'Orsi B., Kilbride S.M., Chen G., Perez Alvarez S., Bonner H.P., Pfeiffer S., Plesnila N., Engel T., Henshall D.C., Düssmann H., Prehn J.H. Bax regulates neuronal Ca²⁺ homeostasis. // *J Neurosci.* 2015; 35(4):1706-1722. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2453-14.2015.
58. Dragan W.L., Oniszczenko W. The association between dopamine D4 receptor exon III polymorphism and intensity of PTSD symptoms among flood survivors. // *Anxiety, Stress & Coping: An International Journal.* 2009; 22(5):483–495.
59. Drury S.S., Brett Z.H., Henry C., Scheeringa M. The association of a novel haplotype in the dopamine transporter with preschool age posttraumatic stress disorder. // *J Child Adolesc Psychopharmacol.* 2013; 23(4):236-243. doi: 10.1089/cap.2012.0072.
60. Drury S.S., Theall K.P., Keats B.J., Scheeringa M. The role of the dopamine transporter (DAT) in the development of PTSD in preschool children. // *J Trauma Stress.* 2009; 22:534–539.
61. Eastwood S.L., Harrison P.J. Hippocampal synaptic pathology in schizophrenia, bipolar disorder and major depression: a study of complexin mRNAs. // *Mol Psychiatry.* 2000; 5(4):425-432.
62. Eckart C., Stoppel C., Kaufmann J., Tempelmann C., Hinrichs H., Elbert T., Heinze H.J., Kolassa I.T. Structural alterations in lateral prefrontal, parietal and posterior midline

- regions of men with chronic posttraumatic stress disorder. // *J Psychiatry Neurosci*. 2011; 36(3):176-186. doi: 10.1503/jpn.100010.
63. Edmondson D., Kronish I.M., Shaffer J.A., Falzon L., Burg M.M. Posttraumatic stress disorder and risk for coronary heart disease: a meta-analytic review. // *Am Heart J*. 2013; 166(5):806-814. doi: 10.1016/j.ahj.2013.07.031.
 64. Ehrlich D. E. , Josselyn S. A. Plasticity-related genes in brain development and amygdala-dependent learning. // *Genes Brain Behav*. 2016; 15(1):125-143. doi: 10.1111/gbb.12255.
 65. Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D., Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2004; 101:17312–17315. doi: 10.1073/pnas.0407162101.
 66. Ernst A., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Perl S., Tisdale J., Possnert G., Druid H., Frisén J. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. // *Cell*. 2014; 156(5):1072-1083. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.044.
 67. Fani N., Gutman D., Tone E.B., Almlil L., Mercer K.B., Davis J., Glover E., Jovanovic T., Bradley B., Dinov I.D., Zamanyan A., Toga A.W., Binder E.B., Ressler K.J. FKBP5 and attention bias for threat: associations with hippocampal function and shape. // *JAMA Psychiatry*. 2013; 70:392–400.
 68. Feuk L., Carson A.R., Scherer S.W. Structural variation in the human genome. // *Nat. Rev. Genet*. 2006; 7(2):85–97.
 69. Feusner J., Ritchie T., Lawford B., Young R.M., Kann B., Noble E.P. GABA (A) receptor beta 3 subunit gene and psychiatric morbidity in a post-traumatic stress disorder population. // *Psychiatry Research*. 2001; 104:109–117.
 70. Fioravante D. , Regehr W. G. Short-term forms of presynaptic plasticity. // *Curr Opin Neurobiol*. 2011; 21(2):269-274. doi: 10.1016/j.conb.2011.02.003.
 71. Fleischmann A., Hvalby O., Jensen V., Strekalova T., Zacher C., Layer L.E., Kvello A., Reschke M., Spanagel R., Sprengel R., Wagner E.F., Gass P. Impaired long-term memory and NR2A-type NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in mice lacking c-Fos in the CNS. // *J Neurosci*. 2003; 23(27):9116-9122.

72. Flor H., Nees F. Learning, memory and brain plasticity in posttraumatic stress disorder: context matters. // *Restor Neurol Neurosci*. 2014; 32(1):95-102. doi: 10.3233/RNN-139013.
73. Flory J.D., Manuck S.B., Ferrell R.E. Memory performance and the apolipoprotein E polymorphism in a community sample of middleaged adults. // *American Journal of Medical Genetics*. 2000; 96:707–711.
74. Francesconi L.P., Ceresér K.M., Mascarenhas R., Stertz L., Gama C.S., Belmonte-de-Abreu P. Increased annexin-V and decreased TNF- α serum levels in chronic-medicated patients with schizophrenia. // *Neurosci. Lett*. 2011; 502(3):143-146.
75. Freeman T., Roca V., Guggenheim F., Kimbrell T., Griffin W.S. Neuropsychiatric associations of apolipoprotein E alleles in subjects with combat-related posttraumatic stress disorder. // *Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2005; 17(4):541-543.
76. Gaire R.K., Smith L., Humbert P., Bailey J., Stuckey P.J., Haviv I. Discovery and analysis of consistent active sub-networks in cancers. // *BMC Bioinformatics*. 2013; 14 Suppl 2:S7. doi: 10.1186/1471-2105-14-S2-S7.
77. Gallagher-Thompson D., O’Hara R., Simmons A. Apolipoprotein E epsilon4 allele affects the relationship between stress and depression in caregivers of patients with Alzheimer’s disease. // *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*. 2001; 14:115–119.
78. Gerke V., Creutz C.E., Moss S.E. Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(6):449–461.
79. Gilman S.R., Iossifov I., Levy D., Ronemus M., Wigler M., Vitkup D. Rare de novo variants associated with autism implicate a large functional network of genes involved in formation and function of synapses. // *Neuron*. 2011; 70(5):898-907. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.021.
80. Glyvuk N., Tsytsyura Y., Geumann C., D’Hooge R., Hüve J., Kratzke M., Baltes J., Boening D., Klingauf J., Schu P. AP1/sigma1Badaptin mediates endosomal synaptic vesicle recycling, learning and memory. // *EMBO J*. 2010; 29(8):1318-1330. doi: 10.1038/emboj.2010.15.
81. Goldstein L.E., Rasmusson A.M., Bunney B.S., Roth R.H. Role of the amygdala in the coordination of behavioral, neuroendocrine, and prefrontal cortical monoamine responses to psychological stress in the rat. // *Journal of Neuroscience*. 1996; 16:4787–4798.

82. Grabe H.J., Spitzer C., Schwahn C., Marcinek A., Frahnw A., Barnow S., Lucht M., Freyberger H.J., John U., Wallaschofski H., Völzke H., Rosskopf D. Serotonin transporter gene (SLC6A4) promoter polymorphisms and the susceptibility to posttraumatic stress disorder in the general population. // *Am J Psychiatry*. 2009; 166(8):926-33. doi: 10.1176/appi.ajp.2009.08101542.
83. Graves D.T., Kayal R.A. Diabetic complications and dysregulated innate immunity. // *Frontiers in Bioscience*. 2009; 13:1227–1239.
84. Greenwood P.M., Parasuraman R. Neuronal and cognitive plasticity: a neurocognitive framework for ameliorating cognitive aging. // *Front Aging Neurosci*. 2010; 2:150. doi:10.3389/fnagi.2010.00150.
85. Gutman A.R., Yang Y., Ressler K.J., Davis M. The role of neuropeptide Y in the expression and extinction of fear-potentiated startle. // *J Neurosci*. 2008; 28:12682–12690.
86. Hamilton L.K., Joppé S.E., M Cochard L., Fernandes K.J. Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here. // *Eur J Neurosci*. 2013; 37(12):1978-1986. doi: 10.1111/ejn.12207.
87. Hamner M.B., Diamond B.I. Elevated plasma dopamine in posttraumatic stress disorder: a preliminary report. // *Biological Psychiatry*. 1993; 33:304–306.
88. Hasegawa T., Mikoda N., Kitazawa M., LaFerla F.M. Treatment of Alzheimer's disease with anti-homocysteic acid antibody in 3xTg-AD male mice. // *PLoS One*. 2010; 5:e8593. doi: 10.1371/journal.pone.0008593.
89. Hashimoto R., Hough C., Nakazawa T., Yamamoto T., Chuang D.M. Lithium protection against glutamate excitotoxicity in rat cerebral cortical neurons: involvement of NMDA receptor inhibition possibly by decreasing NR2B tyrosine phosphorylation. // *J Neurochemistry*. 2002; 80:589–597.
90. He M., Wei J.X., Mao M., Zhao G.Y., Tang J.J., Feng S., Lu X.M., Wang Y.T. Synaptic Plasticity in PTSD and associated Comorbidities: The Function and Mechanism for Diagnostics and Therapy. // *Curr Pharm Des*. 2018; 24(34):4051-4059. doi: 10.2174/1381612824666181120094749.

91. Heim C., Ehlerth U., Hellhammer D.H. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. // *Psychoneuroendocrinology*. 2000; 25:1-35.
92. Heine V.M., Maslam S., Joels M., Lucassen P.J. Increased P27KIP1 protein expression in the dentate gyrus of chronically stressed rats indicates G1 arrest involvement. // *Neuroscience*. 2004; 129(3):593-601.
93. Heldt S.A., Stanek L., Chhatwal J.P., Ressler K.J. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. // *Mol Psychiatry*. 2007; 12:656–670.
94. Hiyama E., Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. // *Br. J. Cancer*. 2007; 96:1020–1024. doi: 10.1038/sj.bjc.6603671
95. Hoffman A.N., Lorson N.G., Sanabria F., Foster Olive M., Conrad C.D. Chronic stress disrupts fear extinction and enhances amygdala and hippocampal Fos expression in an animal model of post-traumatic stress disorder. // *Neurobiol Learn Mem*. 2014; 112:139-147. doi: 10.1016/j.nlm.2014.01.018.
96. Hong M., Park N., Chun Y.J. Role of annexin a5 on mitochondria-dependent apoptosis induced by tetramethoxystilbene in human breast cancer cells. // *Biomol Ther*. 2014; 22(6):519-524.
97. Huckins L.M., Breen M.S., Chatzinakos C., Hartmann J., Klengel T., da Silva Almeida A.C., Dobbyn A., Girdhar K., Hoffman G., Klengel C., Logue M., Lori A., Morrison F., Nguyen H.T., Park Y., Ruderfer D., Sloofman L.G., van Rooij S.J.H., PTSD Working Group of Psychiatric Genomics Consortium, Baker D.G., Chen C.Y., Cox N., Duncan L.E., Geyer M.A., Glatt S.J., Kyung Im H., Maihofer A.X., Risbrough V.B., Smoller J.W., Stein D.J., Yehuda R., Liberzon I., Koenen K.C., Jovanovic T., Kellis M., Miller M.W., Bacanu S.A., Nievergelt C.M., Buxbaum J.D., Sklar P., Ressler K.J., Stahl E.A., Daskalakis N.P., Analysis of Genetically Regulated Gene Expression Identifies a Trauma Type Specific PTSD Gene, SNRNP35. // *Cell*. 2019. Available at SSRN: <https://ssrn.com/abstract=3353219> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.3353219>
98. Hori H., Kim Y. Inflammation and post-traumatic stress disorder. // *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019. doi: 10.1111/pcn.12820.

99. Inglis F.M., Moghaddam B. Dopaminergic innervation of the amygdala is highly responsive to stress. // *Journal of Neurochemistry*. 1999; 72:1088–1094.
100. Jarskog L.F., Selinger E.S., Lieberman J.A., Gilmore J.H. Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. // *Am J Psychiatry*. 2004; 161(1):109–115.
101. Kaabi B., Gelernter J., Woods S.W., Goddard A., Page G.P., Elston R.C. Genome scan for loci predisposing to anxiety disorders using a novel multivariate approach: strong evidence for a chromosome 4 risk locus. // *Am J Hum Genet*. 2006; 78:543–553.
102. Kang H.K., Natelson B.H., Mahan C.M., Lee K.Y., Murphy F.M. Post-Traumatic Stress Disorder and Chronic Fatigue Syndrome-like illness among Gulf War Veterans: A population-based survey of 30,000 Veterans. // *American Journal of Epidemiology*. 2003; 157(2):141-148.
103. Kato T., Konishi Y., Shimohama S., Beach T.G., Akatsu H., Tooyama I. Alpha1-chimaerin, a Rac1 GTPase-activating protein, is expressed at reduced mRNA levels in the brain of Alzheimer's disease patients. // *Neurosci Lett*. 2011; 591:19-24. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.013.
104. Kenna G.A., Roder-Hanna N., Leggio L., Zywiak W.H., Clifford J., Edwards S., Kenna J.A., Shoaff J., Swift R.M. Association of the 5-HTT gene-linked promoter region (5-HTTLPR) polymorphism with psychiatric disorders: review of psychopathology and pharmacotherapy. // *Pharmacogenomics Pers Med*. 2012; 5:19–35.
105. Kessler R.C., Berglund P., Delmer O., Jin R., Merikangas K.R., Walters E.E. Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. // *Archives of General Psychiatry*. 2005a; 62(6):593-602.
106. Kessler R.C., Chiu W.T., Demler O., Merikangas K.R., Walters E.E. Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. // *Archives of General Psychiatry*. 2005b; 62(6):617-627.
107. Kibler J.L., Ma M., Tursich M., Malcolm L., Llabre M.M., Greenberg R., Gold S.N., Beckham J.C. Cardiovascular risks in relation to posttraumatic stress severity among young trauma-exposed women. // *J Affect Disord*. 2018; 241:147-153. doi: 10.1016/j.jad.2018.08.007.

108. Kilaru V., Iyer S.V., Almli L.M., Stevens J.S., Lori A., Jovanovic T., Ely T.D., Bradley B., Binder E.B., Koen N., Stein D.J., Conneely K.N., Wingo A.P., Smith A.K., Ressler K.J. Genome-wide gene-based analysis suggests an association between Neuroligin 1 (NLGN1) and post-traumatic stress disorder. // *Transl Psychiatry*. 2016; 6:e820. doi: 10.1038/tp.2016.69.
109. Kilpatrick D.G., Koenen K.C., Ruggiero K.J., Acierno R., Galea S., Resnick H.S., Roitzsch J., Boyle J., Gelernter J. The serotonin transporter genotype and social support and moderation of post-traumatic stress disorder and depression in hurricane-exposed adults. // *Am J Psychiat*. 2007; 164:1693–1699.
110. Kim H.W., Rapoport S.I., Rao J.S. Altered expression of apoptotic factors and synaptic markers in postmortem brain from bipolar disorder patients. // *Neurobiol Disease*. 2010; 37(3): 596–603. doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.010.
111. Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I.W., Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., Gottesman M.M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. // *Science*. 2007; 315(5811):525-528.
112. Kitayama N., Vaccarino V., Kutner M. , Weiss P. , Bremner J. D. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. // *J Affect Disord*. 2005; 88(1):79-86.
113. Koch A.E., Distler O. Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: Rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. // *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(Suppl 2):S3.
114. Koenen K.C., Aiello A.E., Bakshis E., Amstadter A.B., Ruggiero K.J., Acierno R., Kilpatrick D.G., Gelernter J., Galea S. Modification of the association between serotonin transporter genotype and risk of post-traumatic stress disorder in adults by county-level social environment. // *Am J Epidemiol*. 2009; 169:704–711.
115. Kohrt B.A., Worthman C.M., Adhikari R.P., Luitel N.P., Arevalo JM., Ma J., McCreath H., Seeman T.E., Crimmins E.M., Cole S.W. Psychological resilience and the gene regulatory impact of posttraumatic stress in Nepali child soldiers. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(29):8156-8161. doi: 10.1073/pnas.1601301113.

116. Kolassa I., Ertl V., Eckart C., Glöckner F., Kolassa S., Papassotiropoulos A., de Quervain D.J., Elbert T. Association study of trauma load and SLC6A4 promoter polymorphism in posttraumatic stress disorder: evidence from survivors of the Rwandan genocide. // *J Clin Psychiatry*. 2010a; 71(5):543-547. doi: 10.4088/JCP.08m04787blu.
117. Kolassa I., Kolassa S., Ertl V., Papassotiropoulos A., De Quervain D.J. The risk of posttraumatic stress disorder after trauma depends on traumatic load and the Catechol-O-Methyltransferase Val158Met polymorphism. // *Biol Psychiatry*. 2010b; 67(4):304-308. doi: 10.1016/j.biopsych.2009.10.009.
118. Komar A.A. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. // *Pharmacogenomics*. 2007; 8(8):1075-1080.
119. Kroboth P.D., Salek F.S., Pittenger A.L., Fabian T.J., Frye R.F. DHEA and DHEA: A review. // *Journal of Clinical Pharmacology*. 1999; 39:327–348.
120. Kuan P.F., Waszczuk M.A., Kotov R., Clouston S., Yang X., Singh P.K., Glenn S.T., Cortes Gomez E., Wang J., Bromet E., Luft B.J. Gene expression associated with PTSD in World Trade Center responders: An RNA sequencing study. // *Transl Psychiatry*. 2017; 7(12):1297. doi: 10.1038/s41398-017-0050-1.
121. Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. // *J Neurosci*. 1996; 16(6):2027-2033.
122. Kulka R.A., Schlenger W.A., Fairbanks J.A., Hough R.L., Jordan B.K., Marmar C.R., Cranston A.S. Trauma and the Vietnam War generation: Report of findings from the National Vietnam Veterans Readjustment Study. New York: Brunner/Mazel: 1990
123. Kumar A., Singh R.L., Babu G.N. Cell death mechanisms in the early stages of acute glutamate neurotoxicity. // *Neurosci Res*. 2010; 66:271–278.
124. Kung J.C., Chen T.C., Shyu B.C., Hsiao S., Huang A.C. Anxiety- and depressive-like responses and c-fos activity in preproenkephalin knockout mice: oversensitivity hypothesis of enkephalin deficit-induced posttraumatic stress disorder. // *J Biomed Sci*. 2010; 17:29. doi: 10.1186/1423-0127-17-29.

125. Kuo J.R., Kaloupek D.G., Woodward S.H. Amygdala volume in combat-exposed veterans with and without posttraumatic stress disorder: a cross-sectional study. // *Arch Gen Psychiatry*. 2012; 69(10):1080-1086. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2012.73.
126. Lappalainen J., Kranzler H., Malison R., Price L.H., Van Dyck C., Rosenheck R.A., Cramer J., Southwick S., Charney D., Krystal J., Gelernter J. A functional neuropeptide Y Leu7Pro polymorphism associated with alcohol dependence in a large population sample from the United States. // *Arch Gen Psychiatry*. 2002; 59(9):825-831.
127. Lazarov O., Demars M.P. All in the Family: How the APPs Regulate Neurogenesis. // *Front Neurosci*. 2012; 6:81. doi: 10.3389/fnins.2012.00081.
128. Lederer C.W., Torrisi A., Pantelidou M., Santama N., Cavallaro S. Pathways and genes differentially expressed in the motor cortex of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. // *BMC Genomics*. 2007; 8:26.
129. Lee H.J., Kwak S.K., Paik J.W., Kang R.H., Lee M.S. Association between serotonin 2A receptor gene polymorphism and posttraumatic stress disorder. // *Psychiatry Investigation*. 2007; 4(2):104-108.
130. Lee H.J., Kang R.H., Lim S.W., Paik J.W., Choi M.J., Lee M.S. No association between the brain derived neurotrophic factor gene Val66Met polymorphism and post traumatic stress disorder. // *Stress and Health*. 2006; 22(2):115-119.
131. Lee H.J., Lee M.S., Kang R.H., Kim H., Yim S.D., Kee B.S., Kim Y.H., Kim Y.K., Kim J.B., Yeon B.K., Oh K.S., Oh B.H., Yoon J.S., Lee C., Jung H.Y., Chee I.S., Paik I.H. Influence of the serotonin transporter promoter gene polymorphism on susceptibility to post-traumatic stress disorder. // *Depress Anxiety*. 2005; 21:135–139.
132. Lesch K.P., Bengel D., Heils A., Sabol S.Z., Greenberg B.D., Petri S., Benjamin J., Muller C.R., Hamer D.H., Murphy D.L. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. // *Science*. 1996; 274:1527–1531.
133. Leuner B., Kozorovitskiy Y., Gross C.G., Gould E. Diminished adult neurogenesis in the marmoset brain precedes old age. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(43):17169-17173.

134. Li X., Han F., Liu D., Shi Y. Changes of Bax, Bcl-2 and apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. // *Neurol Res.* 2010a; 32(6):579-586. doi: 10.1179/016164110X12556180206194.
135. Li X.M., Han F., Liu D.J., Shi Y.X. Single-prolonged stress induced mitochondrial-dependent apoptosis in hippocampus in the rat model of post-traumatic stress disorder. // *J Chem Neuroanat.* 2010b; 40(3):248-255. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.07.001.
136. Li Y., Han F., Shi Y. Increased neuronal apoptosis in medial prefrontal cortex is accompanied with changes of Bcl-2 and Bax in a rat model of post-traumatic stress disorder. // *J Mol Neurosci.* 2013; 51(1):127-137. doi: 10.1007/s12031-013-9965-z.
137. Lindauer R.J., Vlieger E.J., Jalink M., Olf M., Carlier I.V., Majoie C.B., Den Heeten G.J., Gersons B.P. Effects of psychotherapy on hippocampal volume in out-patients with post-traumatic stress disorder: a MRI investigation. // *Psychol Med.* 2005; 35(10):1421-1431.
138. Lindqvist D., Epel E.S., Mellon S.H., Penninx B.W., Révész D., Verhoeven J.E., Reus V.I., Lin J., Mahan L., Hough C.M., Rosser R., Bersani F.S., Blackburn E.H., Wolkowitz O.M. Psychiatric disorders and leukocyte telomere length: Underlying mechanisms linking mental illness with cellular aging. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015; 55:333–364. doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.05.007.
139. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. // *Genome Biology.* 2014; 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
140. Lu A.T., Ogdie M.N., Järvelin M.R., Moilanen I.K., Loo S.K., McCracken J.T., McGough J.J., Yang M.H., Peltonen L., Nelson S.F., Cantor R.M., Smalley S.L. Association of the cannabinoid receptor gene (CNR1) with ADHD and post-traumatic stress disorder. // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2008; 147B(8):1488-1494. doi: 10.1002/ajmg.b.30693.
141. Machado-Vieira R., Manji H.K., Zarate C.A. The role of the tripartite glutamatergic synapse in the pathophysiology and therapeutics of mood disorders. // *Neuroscientist.* 2009a; 15(5):525–539. doi: 10.1177/1073858409336093.
142. Machado-Vieira R., Pivovarova N.B., Stanika R.I., Yuan P., Wang Y., Zhou R., Zarate C.A. Jr, Drevets W.C., Brantner C.A., Baum A., Laje G., McMahon F.J., Chen G., Du J.,

- Manji H.K., Andrews S.B. The Bcl-2 gene polymorphism rs956572AA increases inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated endoplasmic reticulum calcium release in subjects with bipolar disorder. // *Biol Psychiatry*. 2011; 69:344–352. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.10.019.
143. Machado-Vieira R., Salvadore G., Ibrahim L.A., Diaz-Granados N., Zarate C.A. Jr. Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders. // *Curr Pharm Des*. 2009b; 15(14):1595–1611.
144. Maes M., Lin A.H., Delmeire L., Van Gastel A., Kenis G., De Jongh R., Bosmans E. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. // *Biol Psychiatry*. 1999; 45(7):833–839.
145. Mahan A.L., Ressler K.J. Fear conditioning, synaptic plasticity and the amygdala: implications for posttraumatic stress disorder. // *Trends Neurosci*. 2012; 35(1):24-35. doi: 10.1016/j.tins.2011.06.007.
146. Maheu M.E., Ressler K.J. Developmental pathway genes and neural plasticity underlying emotional learning and stress-related disorders. // *Learn Mem*. 2017; 24(9):492-501. doi: 10.1101/lm.044271.116.
147. Makino T., Gojobori T. The evolutionary rate of a protein is influenced by features of the interacting partners. // *Mol Biol Evol*. 2006; 23(4):784-789.
148. Malaspina D., Dracxler R., Walsh-Messinger J., Harlap S., Goetz R.R., Keefe D., Perrin M.C. Telomere length, family history, and paternal age in schizophrenia. // *Mol. Genet. genomic Med*. 2014; 2:326–231. doi: 10.1002/mgg3.71.
149. Manji H. Bcl-2: A key regulator of affective resilience in the pathophysiology and treatment of severe mood disorders. // *Biol Psychiatry*. 2008; 63(Suppl 1): 243S.
150. Matter-Reissmann U.B., Forte P., Schneider M.K., Filgueira L., Groscurth P., Seebach J.D. Xenogeneic human NK cytotoxicity against porcine endothelial cells is perforin/granzyme B dependent and not inhibited by Bcl-2 overexpression. // *Xenotransplantation*. 2002; 9(5):325–327.

151. McEwen B. S. , Eiland L. , Hunter R. G. , Miller M. M. Stress and anxiety: structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. // *Neuropharmacology*. 2012; 62(1):3-12. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.014.
152. McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. // *Genome Biol*. 2016; 17(1):122. doi:10.1186/s13059-016-0974-4.
153. McVean G., Spencer C.C., Chaix R. Perspectives on human genetic variation from the HapMap Project. // *PLoS Genet*. 2005; 1(4):e54.
154. Mehta D., Binder E.B. Gene x environment vulnerability factors for PTSD: the HPA-axis. // *Neuropharmacology*. 2012; 62:654–662.
155. Mellman T.A., Alim T., Brown D.D., Gorodetsky E., Buzas B., Lawson W.B., Goldman D., Charney D.S. Serotonin polymorphisms and post-traumatic stress disorder in a Trauma exposed African American population. // *Depress Anxiety*. 2009; 26:993–997.
156. Meloni E.G., Davis M. Enhancement of the acoustic startle response in rats by the dopamine D1 receptor agonist SKF 82958. // *Psychopharmacology*. 1999; 144:373–380.
157. Miao X.R., Chen Q.B., Wei K., Tao K.M., Lu Z.J. Posttraumatic stress disorder: from diagnosis to prevention. // *Mil Med Res*. 2018; 5(1):32. doi: 10.1186/s40779-018-0179-0.
158. Michalek J.E., Kepa A., Vincent J., Frissa S., Goodwin L., Hotopf M., Hatch S.L., Breen G., Powell T.R. Genetic predisposition to advanced biological ageing increases risk for childhood-onset recurrent major depressive disorder in a large UK sample. // *J. Affect. Disord*. 2017; 213:207–213. doi: 10.1016/j.jad.2017.01.017
159. Miller B.R., Hen R. The current state of the neurogenic theory of depression and anxiety. // *Curr Opin Neurobiol*. 2015; 30:51-58. doi: 10.1016/j.conb.2014.08.012.
160. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. // *Nucleic Acids Res*. 1988; 16(3):1215.
161. Moisés E.B., Andréa W., Lopes R.P., Teixeira A.L., Grassi-Oliveira R. Interplay between Neuroimmunoendocrine Systems during Post-Traumatic Stress Disorder:A Minireview. // *Neuroimmunomodulation*. 2010; 17:192–195.

162. Morey R.A., Gold A.L., LaBar K.S., Beall S.K., Brown V.M., Haswell C.C., Nasser J.D., Wagner H.R., McCarthy G. Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group. // *Arch Gen Psychiatry*. 2012; 69(11):1169-1178.
163. Morla M., Busquets X., Pons J., Sauleda J., MacNee W., Agustí A.G.N. Telomere shortening in smokers with and without COPD. // *Eur. Respir. J*. 2006; 27:525-528.
164. Moss S.E., Morgan R.O. The annexins. // *Genome Biol*. 2004; 5(4):219.
165. Mussunoor S., Murray G.I. The role of annexins in tumor development and progression. // *J Pathol*. 2008; 216(2):131-140.
166. Mustapić M., Pivac N., Kozarić-Kovacić D., Dezeljin M., Cubells J.F., Mück-Seler D. Dopamine beta-hydroxylase (DBH) activity and-1021C/T polymorphism of DBH gene in combat-related post-traumatic stress disorder. // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007; 144B(8):1087-1089.
167. Nakamura M., Ueno S., Sano A., Tanabe H. The human serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) shows ten novel allelic variants. // *Mol Psychiatry*. 2000; 5:32-38.
168. Nathan P.J., Cobb S.R., Lu B., Bullmore E.T., Davies C.H. Studying synaptic plasticity in the human brain and opportunities for drug discovery. // *Curr Opin Pharmacol*. 2011; 11(5):540-548. doi: 10.1016/j.coph.2011.06.008.
169. Nelson E.C., Agrawal A., Pergadia M.L., Lynskey M.T., Todorov A.A., Wang J.C., Todd R.D., Martin N.G., Heath A.C., Goate A.M., Montgomery G.W., Madden P.A. Association of childhood trauma exposure and the risk of posttraumatic stress disorder in adults. // *Mol Psychiatry*. 2009; 14(3):234-235. doi: 10.1038/mp.2008.81.
170. Norrholm S.D., Ressler K.J. Genetics of anxiety and trauma-related disorders. // *Neuroscience*. 2009; 164:272-287.
171. Olariu A., Cleaver K.M., Cameron H.A. Decreased neurogenesis in aged rats results from loss of granule cell precursors without lengthening of the cell cycle. // *J Comp Neurol*. 2007; 501(4):659-667.
172. Pace T.W., Heim C.M. A short review on the psychoneuroimmunology of posttraumatic stress disorder: from risk factors to medical comorbidities. // *Brain Behav Immun*. 2011; 25(1):6-13.

173. Panaretakis T., Pokrovskaja K., Shoshan M.C., Grandér D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. // *J Biol Chem.* 2002; 277(46):44317-44326.
174. Pape H.C., Pare D. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. // *Physiol Rev.* 2010; 90(2):419-463. doi: 10.1152/physrev.00037.2009.
175. Paydar A., Lee B., Gangadharan G., Lee S., Hwang E.M., Shin H.S. Extrasynaptic GABAA receptors in mediodorsal thalamic nucleus modulate fear extinction learning. // *Mol Brain.* 2014; 7:39. doi: 10.1186/1756-6606-7-39.
176. Perna G., Iannone G., Alciati A., Caldirola D. Are Anxiety Disorders Associated with Accelerated Aging? A Focus on Neuroprogression. // *Neural Plast.* 2016; 2016:8457612. doi: 10.1155/2016/8457612.
177. Perron B., Lewit-Bentley A., Geny B., Russo-Marie F. Can enzymatic activity, or otherwise, be inferred from structural studies of annexin III? // *J Biol Chem* 1997; 272(17):11321-11326.
178. Picking up the peaces (n.d.). Raising awareness about PTSD. // Retrieved February 25, 2019 from <http://pickingupthepeaces.org.au/post-traumatic-stress-disorder-statistics/>.
179. Pittenger C. Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease. // *Dialogues Clin Neurosci.* 2013; 15(4):455-463.
180. Polho G.B., De-Paula V.J., Cardillo G., dos Santos B., Kerr D.S. Leukocyte telomere length in patients with schizophrenia: A meta-analysis. // *Schizophr. Res.* 2015; 165:195-200. doi: 10.1016/j.schres.2015.04.025
181. Poulton R., Andrews G., Millichamp J. Gene-environment interaction and the anxiety disorders. // *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 2008; 258:65-68.
182. Powell T.R., Dima D., Frangou S., Breen G. Telomere Length and Bipolar Disorder. // *Neuropsychopharmacology.* 2018; 43(2):445-453. doi: 10.1038/npp.2017.125.
183. Psychiatric GWAS Consortium Coordinating Committee. Genomewide Association Studies: History, Rationale, and Prospects for Psychiatric Disorders. // *Am J Psychiatry.* 2009; 166:540-556.

184. PTSD alliance (n.d.). About PTSD: statistics. // Retrieved February 25, 2019 from http://www.ptsdalliance.org/about_what.html
185. Puglisi-Allegra S., Cabib S. Psychopharmacology of dopamine: the contribution of comparative studies in inbred strains of mice. // *Prog Neurobiol.* 1997; 51(6):637-661.
186. Qiao L.Y. Neurotrophin signaling and visceral hypersensitivity. // *Front Biol* 2014; 9(3):216-224.
187. Raison C.L., Miller A.H. When not enough is too much: The role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. // *American Journal of Psychiatry.* 2003; 160(9):1554-1565.
188. Raivich G., Behrens A. Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. // *Prog Neurobiol.* 2006; 78(6):347-363.
189. Rao S., Ye N., Hu H., Shen Y., Xu Q. Variants in TERT influencing telomere length are associated with paranoid schizophrenia risk. // *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr.* 2016; 171B(3):317-324. doi: 10.1002/ajmg.b.32403.
190. Recabarren D., Alarcón M. Gene networks in neurodegenerative disorders. // *Life Sci.* 2017; 183:83-97. doi: 10.1016/j.lfs.2017.06.009.
191. Reutelingsperger C.P.M., van Heerde W.L. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. // *Cell. Mol. Life Sci.* 1997; 53:527-532.
192. Riddle D. R., Lichtenwalner R. J. Chapter 6. Neurogenesis in the adult and aging brain. // In: *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms* (Editor: D. R. Riddle), Boca Raton, Fla, USA: CRC Press, 2007.
193. Roberts A.L., Koenen K.C., Chen Q., Gilsanz P., Mason S.M., Prescott J., Ratanatharathorn A., Rimm E.B., Sumner J.A., Winning A., De Vivo I., Kubzansky L.D. Posttraumatic stress disorder and accelerated aging: PTSD and leukocyte telomere length in a sample of civilian women. // *Depress Anxiety.* 2017; 34(5):391-400. doi: 10.1002/da.22620.
194. Rosenbaum S., Kreft S., Etich J., Frie C., Stermann J., Grskovic I., Frey B., Mielenz D., Pöschl E., Gaipf U., Paulsson M., Brachvogel B. Identification of novel binding partners

- (annexins) for the cell death signal phosphatidylserine and definition of their recognition motif. // *J Biol Chem* 2011; 286(7):5708-5716. doi: 10.1074/jbc.M110.193086.
195. Sah P., Westbrook R.F., Lüthi A. Fear conditioning and long-term potentiation in the amygdala: what really is the connection? // *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1129:88-95. doi: 10.1196/annals.1417.020.
 196. Sah R., Geraciotti T.D. Neuropeptide Y and post traumatic stress disorder. // *Mol Psychiatry.* 2013; 18(6):646-55. doi: 10.1038/mp.2012.101.
 197. Sailer U., Robinson S., Fischmeister F.P., König D., Oppenauer C., Lueger-Schuster B., Moser E., Kryspin-Exner I., Bauer H. Altered reward processing in the nucleus accumbens and mesial prefrontal cortex of patients with posttraumatic stress disorder. // *Neuropsychologia.* 2008; 46(11):2836-2844. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2008.05.022.
 198. Salanti G., Amountza G., Ntzani E.E., Ioannidis J.P. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. // *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(7):840-848.
 199. Sanyal S., Sandstrom D.J., Hoeffler C.A., Ramaswam M. AP1 functions upstream of CREB to control synaptic plasticity in *Drosophila*. // *Nature.* 2002; 416(6883):870-874.
 200. Sayin A., Kucukyildirim S., Akar T., Bakkaloglu Z., Demircan A., Kurtoglu G., Demirel B., Candansayar S., Mergen H. A prospective study of serotonin transporter gene promoter (5-HTT gene linked polymorphic region) and intron 2 (variable number of Tandem repeats) polymorphisms as predictors of Trauma response to mild physical injury. // *DNA Cell Biol.* 2010; 29:71-77.
 201. Seal K.H., Bertenthal D., Samuelson K., Maguen S., Kumar S., Vasterling J.J. Association between Mild Traumatic Brain Injury and Mental Health Problems and Self-Reported Cognitive Dysfunction in Iraq and Afghanistan Veterans. // *J Rehabil Res Dev.* 2016; 53(2):185-198. doi: 10.1682/JRRD.2014.12.0301.
 202. Segman R., Cooper-Kazaz R., Macciardi F., Goltser T., Halfon Y., Dobroborski T., Shalev A.Y. Association between the dopamine transporter gene and posttraumatic stress disorder. // *Mol Psychiatry.* 2002; 7(8):903-907.
 203. Segman R.H., Shalev A.Y. Genetics of posttraumatic stress disorder. // *CNS Spectr.* 2003; 8(9):693-698.

204. Shibata H., Kanadome T., Sugiura H., Yokoyama T., Yamamuro M., Moss S.E., Maki M. A New Role for Annexin A11 in the Early Secretory Pathway via Stabilizing Sec31A at the Endoplasmic Reticulum Exit Sites (ERES). // *J BiolChem* 2015; 290(8):4981-4993.
205. Shishkina G. T. , Kalinina T. S. , Berezova I. V. , Bulygina V. V. , Dygalo N. N. Resistance to the development of stress-induced behavioral despair in the forced swim test associated with elevated hippocampal Bcl-xl expression. // *Behav Brain Res.* 2010;213(2):218-24. doi: 10.1016/j.bbr.2010.05.003.
206. Sigurdsson T., Doyère V., Cain C.K., LeDoux J.E. Long-term potentiation in the amygdala: a cellular mechanism of fear learning and memory. // *Neuropharmacology.* 2007; 52(1):215-227.
207. Simon N.M., Smoller J.W., McNamara K.L., Maser R.S., Zalta A.K., Pollack M.H., Nierenberg A.A., Fava M., Wong K.K. Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging. // *Biol. Psychiatry.* 2006; 60(5):432-435. doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.004.
208. Siwak-Tapp C.T., Head E., Muggenburg B.A., Milgram N.W., Cotman C.W. Neurogenesis decreases with age in the canine hippocampus and correlates with cognitive function. // *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 88(2):249-259.
209. Skelton K., Ressler K.J., Norrholm S.D., Jovanovic T., Bradley-Davino B. PTSD and gene variants: new pathways and new thinking. // *Neuropharmacology.* 2012; 62:628-637.
210. Smyth G.K. limma: Linear Models for Microarray Data. // In: *Statistics for Biology and Health: Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor* (Editors: Gentleman R., Carey V.J., Huber W., Irizarry R.A., Dudoit S.), Springer, New York, NY, 2005, pp. 474. doi: 10.1007/0-387-29362-0.
211. Soeiro-de-Souza M.G., Salvatore G., Moreno R.A., Otaduy M.C., Chaim K.T., Gattaz W.F., Zarate C.A. Jr, Machado-Vieira R. Bcl-2 rs956572 polymorphism is associated with increased anterior cingulate cortical glutamate in euthymic bipolar I disorder. // *Neuropsychopharmacology.* 2013; 38(3):468-475. doi: 10.1038/npp.2012.203.
212. Soliman F., Glatt C.E., Bath K.G., Levita L., Jones R.M., Pattwell S.S., Jing D., Tottenham N., Amso D., Somerville L.H., Voss H.U., Glover G., Ballon D.J., Liston C., Teslovich T.,

- Van Kempen T., Lee F.S., Casey B.J. A genetic variant BDNF polymorphism alters extinction learning in both mouse and human. // *Science*. 2010; 327:863-866.
213. Song Y., Zhou D., Guan Z., Wang X. Disturbance of serum interleukin-2 and interleukin-8 levels in posttraumatic and non-posttraumatic stress disorder earthquake survivors in Northern China. // *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14:248-254.
214. Southwick S.M., Bremner D., Krystal J.H., Charney D.S. Psychobiologic research in post-traumatic stress disorder. // *Psychiatr Clin North Am*. 1994; 17:251-264.
215. Spitzer R.L., Williams J.B. American psychiatry's transformation following the publication of DSM-III. // *Am J Psychiatry*. 1994; 151(3):459-460.
216. Spivak B., Shohat B., Mester R., Avraham S., Gli-Ad I., Bleich A. Elevated levels of serum interleukin-1 beta in combat-related posttraumatic stress disorder. // *Biol Psychiatry* 1997; 42:345-348.
217. Stein M.B., Jang K.L., Taylor S., Vernon P.A., Livesley W.J. Genetic and environmental influences on trauma exposure and posttraumatic stress disorder symptoms: a twin study. // *Am J Psychiatry*. 2002; 159(10):1675-1681.
218. Sternberg E.M. Neural regulation of innate immunity: A coordinated nonspecific host response to pathogens. // *Nature Reviews Immunology*. 2006; 6:318-328.
219. Sun F., Akazawa S., Sugahara K., Kamihira S., Kawasaki E., Eguchi K., Koji T. Apoptosis in normal rat embryo tissues during early organogenesis: the possible involvement of Bax and Bcl-2. // *Arch Histol Cytol*. 2002; 65(2):145-157.
220. Swairjo M.A., Concha N.O., Kaetzel M.A., Dedman J.R., Seaton B.A. Ca(2+)-bridging mechanism and phospholipid group recognition in the membrane-binding protein annexin V. // *Nat. Struct. Biol*. 1995; 2:968-974.
221. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., Mering C.V. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. // *Nucleic Acids Res*. 2019; 47(D1):D607-D613. doi: 10.1093/nar/gky1131.
222. Tang J. Complexins. // In: *Encyclopedia of Neuroscience* (Editor: Squire L. R.), Elsevier Science, 2009, pp. 12505. doi: 10.1016/B978-008045046-9.01372-3.

223. Tannenberg R.K., Scott H.L., Tannenberg A.E., Dodd P.R. Selective loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: evidence for an increased severity with APOE varepsilon4. // *Neurochem Int.* 2006; 49(7):631-639.
224. Thakur G.A., Joobar R., Brunet A. Development and persistence of post-traumatic stress disorder and the 5-HTTLPR polymorphism. // *J Trauma Stress.* 2009; 22:240-243.
225. The International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. // *Nature.* 2005; 437:1299–1320.
226. Tilli C.M., Stavast-Koey A.J., Ramaekers F.C., Neumann H.A. Bax expression and growth behavior of basal cell carcinomas. // *J Cutan Pathol.* 2002; 29(2):79-87.
227. Tomas A., Futter C., Moss S.E. Annexin 11 is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis. // *J Cell Biol.* 2004; 165(6):813-822.
228. Valdes A.M., Deary I.J., Gardner J., Kimura M., Lu X., Spector T.D., Aviv A., Cherkas L.F. Leukocyte telomere length is associated with cognitive performance in healthy women. // *Neurobiol. Aging.* 2010; 31(6):986-992. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.012.
229. Valente N.L., Vallada H., Cordeiro Q., Migueta K., Bressan R.A., Andreoli S.B., Mari J.J., Mello M.F. Candidate-gene approach in post-traumatic stress disorder after urban violence: association analysis of the genes encoding serotonin transporter, dopamine transporter, and BDNF. // *J Mol Neurosci.* 2011; 44(1):59-67. doi: 10.1007/s12031-011-9513-7.
230. van Zuiden M., Kavelaars A., Geuze E., Olf M., Heijnen C.J. Predicting PTSD: pre-existing vulnerabilities in glucocorticoid-signaling and implications for preventive interventions. // *Brain Behav Immun.* 2013; 30:12-21. doi: 10.1016/j.bbi.2012.08.015.
231. Vanags D.M., Coppola S., Burgess D.H. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. // *Biol. Chem.* 1996; 271:31075–31031.
232. Varela-Nallar L., Aranguiz F.C., Abbott A.C., Slater P.G., Inestrosa N.C. Adult hippocampal neurogenesis in aging and Alzheimer's disease. // *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2010; 90(4):284-96. doi: 10.1002/bdrc.20193.
233. Vermetten E., Schmahl C., Lindner S., Loewenstein R.J., Bremner J.D. Hippocampal and amygdalar volumes in dissociative identity disorder. // *Am J Psychiatry.* 2006; 163(4):630-636.

234. Voisey J., Swagell C., Hughes I.P., Morris C.P., van Daal A., Noble E.P., Kann B., Heslop K.A., Young R.M., Lawford B.R. The DRD2 gene 957C> T polymorphism is associated with posttraumatic stress disorder in war veterans. *Depression and Anxiety*. 2009; 26(1):28-33. doi: 10.1002/da.20517.
235. von Känel R., Hepp U., Kraemer B., Traber R., Keel M., Mica L., Schnyder U. Evidence for low-grade systemic proinflammatory activity in patients with posttraumatic stress disorder. // *Journal of Psychiatric Research*. 2007; 41:744-752.
236. Waldmeier P. C. , Tatton W. G. Interrupting apoptosis in neurodegenerative disease: potential for effective therapy? // *Drug Discov Today*. 2004; 9(5):210-218.
237. Wang J., Guo C., Liu S., Qi H., Yin Y., Liang R., Sun M.Z., Greenaway F.T. Annexin A11 in disease. // *Clin Chim Acta*. 2014; 431:164-168. doi: 10.1016/j.cca.2014.01.031.
238. Wang Q., Zhang L., Yuan X., Ou Y., Zhu X., Cheng Z., Zhang P., Wu X., Meng Y., Zhang L. The Relationship between the Bcl-2/Bax Proteins and the Mitochondria-Mediated Apoptosis Pathway in the Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells into Neurons. // *PLoS One*. 2016; 11(10):e0163327. doi: 10.1371/journal.pone.0163327
239. Wang Y., Armstrong S.A. Genome-wide SNP analysis in cancer: leukemia shows the way. // *Cancer Cell*. 2007; 11(4):308–309.
240. Wang Z., Baker D.G., Harrer J., Hamner M., Price M., Amstadter A. The relationship between combat-related post-traumatic Genetics, epigenetics, and neuroimaging genetics of PTSD 15 stress disorder and the 5-HTTLPR/rs25531 polymorphism. // *Depress Anxiety*. 2011; 28:1067-1073.
241. Weathers F.W., Blake D.D., Schnurr P.P., Kaloupek D.G., Marx B.P., Keane T.M. The Clinician-Administered PTSD Scale for DSM-5 (CAPS-5). // Interview available from the National Center for PTSD at www.ptsd.va.gov. 2013.
242. Weathers F.W., Blake D.D., Schnurr P.P., Kaloupek D.G., Marx B.P., Keane T.M. The Life Events Checklist for DSM-5 (LEC-5). Instrument available from the National Center for PTSD at www.ptsd.va.gov. 2013.
243. Weathers F.W., Litz B.T. Psychometric properties of the Clinician-Administered PTSD Scale - Form 1 (CAPS-1). // *PTSD Research Quarterly*. 1994; 5:2-6.

244. Wei Y. Bin, Martinsson L., Liu J.J., Forsell Y., Schalling M., Backlund L., Lavebratt C. hTERT genetic variation in depression. // *J. Affect. Disord.* 2016; 189:62–69. doi: 10.1016/j.jad.2015.09.025.
245. Weinrich S.L., Pruzan R., Ma L., Ouellette M., Tesmer V.M., Holt S.E., Bodnar A.G., Lichtsteiner S., Kim N.W., Trager J.B., Taylor R.D., Carlos R., Andrews W.H., Wright W.E., Shay J.W., Harley C.B., Morin G.B. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. // *Nat. Genet.* 1997; 17(4):498-502.
246. Welsh, K. I., Bunce, M. 1999. Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Reviews in Immunogenetics* 1:157-176.
247. White M.G., Bogdan R., Fisher P.M., Munoz K.E., Williamson D.E., Hariri A.R. FKBP5 and emotional neglect interact to predict individual differences in amygdala reactivity. // *Genes Brain Behav.* 2012; 11:869–878.
248. Wilcox J.A., Quadri S. Replication of NTNG1 Association in Schizophrenia. // *Psychiatric Genetics.* 2014; 24(6):266-268. doi: 10.1097/YPG.0000000000000061.
249. Wingo A.P., Almlil L.M., Stevens J.S., Klengel T., Uddin M., Li Y., Bustamante A.C., Lori A., Koenen K.C., Stein D.J., Smith A.K., Aiello A.E., Koenen K.C., Wildman D.E., Galea S., Bradley B., Binder E.B., Jin P., Gibson G., Ressler K.J. DICER1 and microRNA regulation in post-traumatic stress disorder with comorbid depression. // *Nat Commun.* 2015; 6:10106. doi: 10.1038/ncomms10106.
250. Wolf E.J., Mitchell K.S., Logue M.W., Baldwin C.T., Reardon A.F., Aiello A., Galea S., Koenen K.C., Uddin M., Wildman D., Miller M.W. The dopamine d3 receptor gene and posttraumatic stress disorder. // *J Trauma Stress.* 2014; 27(4):379-387. doi: 10.1002/jts.21937
251. Woods A.B., Page G.G., O'Campo P., Pugh L.C., Ford D., Campbell J.C. The mediation effect of posttraumatic stress disorder symptoms on the relationship of intimate partner violence and IFN-gamma levels. // *Am J Community Psychol.* 2005; 36:159-175.
252. World Health Organization. The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: World Health Organization: 1992.

253. Xie P., Kranzler H.R., Farrer L., Gelernter J. Serotonin transporter 5-HTTLPR genotype moderates the effects of childhood adversity on post-traumatic stress disorder risk: a replication study. // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2012; 159B:644-652.
254. Xie P., Kranzler H.R., Poling J., Stein M.B., Anton R.F., Farrer L.A., Gelernter J. Interaction of FKBP5 with childhood adversity on risk for post-traumatic stress disorder. // *Neuropsychopharmacology.* 2010; 35(8):1684-1692. doi: 10.1038/npp.2010.37.
255. Xie P.X., Kranzler H.R., Poling J., Stein M.B., Anton R.F., Brady K., Weiss R.D., Farrer L., Gelernter J. Interactive effect of stressful life events and the serotonin transporter 5-HTTLPR genotype on posttraumatic stress disorder diagnosis in 2 independent populations. // *Arch Gen Psychiatry.* 2009; 66(11):1201-1209. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.153.
256. Xu X., Chen X., Zhang X., Liu Y., Wang Z., Wang P., Du Y., Qin Y., Chen Z.J. Impaired telomere length and telomerase activity in peripheral blood leukocytes and granulosa cells in patients with biochemical primary ovarian insufficiency. // *Hum. Reprod.* 2017; 32(1):201-207.
257. Yaffe K., Lindquist K., Kluse M., Cawthon R., Harris T., Hsueh W.C., Simonsick E.M., Kuller L., Li R., Ayonayon H.N., Rubin S.M., Cummings S.R., Health ABC Study. Telomere length and cognitive function in community-dwelling elders: findings from the Health ABC Study. // *Neurobiol. Aging.* 2011; 32:2055-2060.
258. Yan Q., Liu J.P., Li D.W. Apoptosis in lens development and pathology. // *Differentiation.* 2006; 74(5):195-211.
259. Yehuda R. Current status of cortisol findings in post-traumatic stress disorder. // *Psychiatr. Clin. N. Am.* 2002; 25:341-368.
260. Yehuda R. Disease Markers: Molecular Biology of PTSD. // *Dis Markers.* 2011; 30(2-3):61-65.
261. Yehuda R. Status of glucocorticoid alterations in posttraumatic stress disorder. // *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1179:56-69.
262. Yehuda R., Southwick S., Giller E.L., Ma X., Mason J.W. Urinary catecholamine excretion and severity of PTSD symptoms in Vietnam combat veterans. // *J Nerv Ment Dis.* 1992; 180:321-325.

263. Yehuda R., Southwick S.M., Krystal J.H., Bremner D., Charney D.S., Mason J.W. Enhanced suppression of cortisol following dexamethasone administration in post-traumatic stress disorder. // *Am J Psychiatry*. 1993; 150:83-86.
264. Young R.M., Lawford B.R., Noble E.P., Kann B., Wilkie A., Ritchie T., Arnold L., Shadforth S. Harmful drinking in military veterans with post-traumatic stress disorder: association with the D2 dopamine receptor A1 allele. // *Alcohol and Alcoholism*. 2002; 37(5):451-456.
265. Zhang H., Ozbay F., Lappalainen J., Kranzler H.R., van Dyck C.H., Charney D.S., Price L.H., Southwick S., Yang B.Z., Rasmussen A., Gelernter J. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene variants and Alzheimer's disease, affective disorders, posttraumatic stress disorder, schizophrenia, and substance dependence. // *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2006; 141B(4):387-393.
266. Zhao Z., Fu Y.X., Hewett-Emmett D., Boerwinkle E. Investigating single nucleotide polymorphism (SNP) density in the human genome and its implications for molecular evolution. // *Gene*. 2003; 312:207–213.
267. Zhong L.T., Kane D.J., Bredesen D.E. BCL-2 blocks glutamate toxicity in neural cell lines. *Brain research*. // *Molecular Brain Res*. 1993; 19: 353-355.
268. Zimmermann A.K., Loucks F.A., Schroeder E.K., Bouchard R.J., Tyler K.L., Linseman D.A. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria. // *J Biol Chemistry*. 2007; 282(40):29296-29304.