

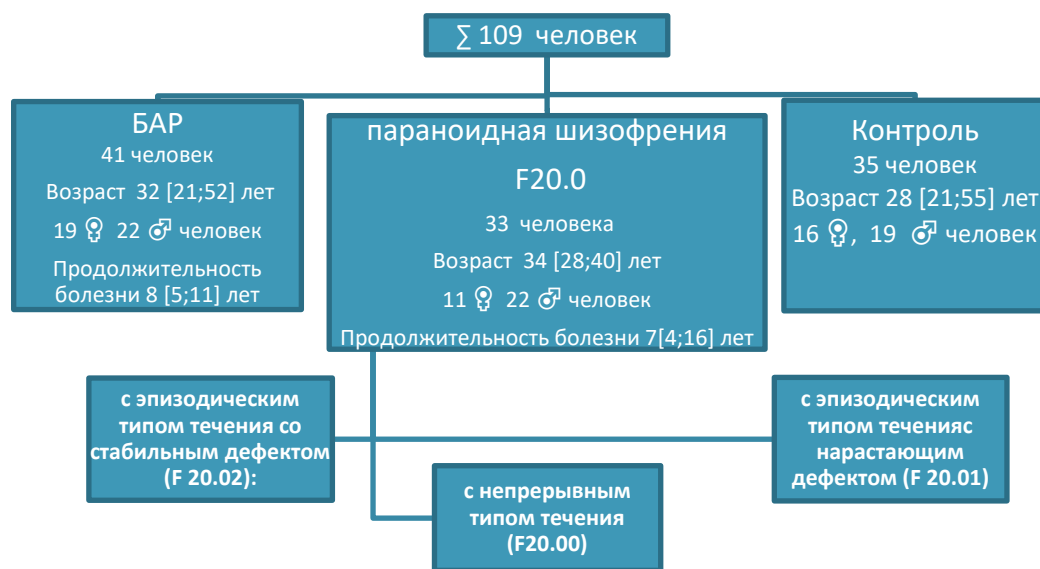
# Особенности протеемного спектра больных биполярным аффективным расстройством и шизофренией

Серегин А. А., Смирнова Л. П., Дмитриева Е. М., Симуткин Г. Г., Семке А. В., Иванова С. А.

Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, НИИ психического здоровья. г. Томск, ул. Алеутская, 4. [mental@tnimc.ru](mailto:mental@tnimc.ru)

- Шизофрения и биполярное аффективное расстройство (БАР) - представляют собой гетерогенную группу психических расстройств с неясной этиологией и патофизиологическими механизмами.
- Значительные трудности представляет дифференциальная диагностика БАР с униполярной депрессией, а также с расстройствами шизофренического спектра. Наиболее часто пациентам с БАР на начальном этапе заболевания ставят диагноз депрессии (60%), тревожных расстройств (26%), шизофрении (18%), и шизоаффективных расстройств (11%) (R.M. Hirschfield et al., 2003; G. Perugi, 2010). Так по данным ВОЗ, коэффициент отношения распространенности шизофрении к БАР в мире равен 0,7 (Bruckner T.A. et al., 2011). В США он достигает 2,3 (Kessler R.C. et al., 2005).
- Кроме того депрессия является одним из наиболее распространенных сопутствующих синдромов при шизофрении не менее чем у 25–60 % больных (van Rooijen G et al., 2018; Jones P.B et al., 2009..) и ассоциирована с более частыми психотическими эпизодами (Buckley P.F. et al., 2009), увеличением продолжительности болезни (Whitehead C. et al., 2003).
- Коморбидная депрессия снижает качество ремиссии и уровень социального функционирования больных шизофренией (Mazo G.E. et al., 2017; Mosolov S.N. et al., 2014. P; Juckel G. et al., 2014). Что приводит к снижению качества жизни и повышению риска суицида (Saha S. et al., 2007).
- Проявления депрессии необходимо дифференцировать с первичной негативной симптоматикой и с побочными эффектами антипсихотической терапии, включая индуцированную нейролептиками дисфорию, акинезию и акатизию (Мосолов С.Н и др. 2018).
- Поскольку диагностика психических расстройств основана только на клинических симптомах, возникает необходимость в разработке дополнительных методов биохимической / параклинической диагностики, что делает актуальным поиск потенциальных маркеров БАР и шизофрении
- До настоящего времени не были обнаружены белковые маркеры, характерные только для одного конкретного заболевания. Все обнаруженные белки (и пути, в которых они участвуют) не специфичны для патогенеза психических расстройств.
- Можно предположить, что в конечном итоге исследования не должны быть направлены на поиск определенного белка - маркера, а скорее на выявление набора белков, отражающего основные патогенетические механизмы и служащие дополнительными критериями дифференциальной диагностики и прогноза психического заболевания.
- Особенность протеомных исследований заключается в возможности обнаруживать белковые биомаркеры, связанные с функциональными нарушениями, участвующими в патофизиологии заболеваний, без необходимости выдвижения гипотезы и ограничения ею области поиска (Martins-de-Souza et al., 2010).
- Кроме того, обнаружение таких биомаркеров открывает возможность обнаружения мишеней медикаментозного лечения, что может способствовать созданию новых лекарственных препаратов и может привести к разработке новых терапевтических подходов.
- Таким образом выявление маркеров, участвующих в патогенезе психических расстройств, а также значимых клинико-биологических корреляций является актуальной проблемой и выявление потенциальных белковых маркеров, участвующих в патогенезе БАР и шизофрении может способствовать улучшению своевременной диагностики этих расстройств, а также улучшению и развитию новых методов терапии, что, в конечном счете, позволит повысить эффективность лечения, снизить риск суицидального поведения и повысить качество жизни больных.
- **Целью нашего исследования было выявить различия в протеомах сыворотки крови больных шизофренией и БАР.**

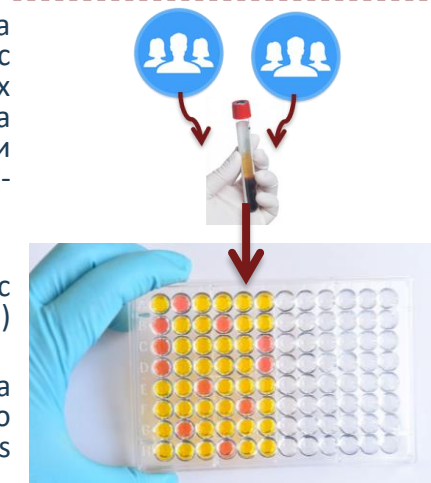
## Распределение обследуемых по группам



- Больные были госпитализированы в остром состоянии.
- Диагнозы были выставлены врачами-психиатрами НИИ психического здоровья Томского НИМЦ в соответствии с международным классификатором МКБ-10.
- Критериями исключения для всех исследуемых групп было наличие острых или хронических инфекций, воспалительных, аутоиммунных заболеваний, а также острых инфекций не менее чем за 4 недели до исследования.
- Группу контроля составили психически и соматически здоровые лица
- Кровь для исследования брали после госпитализации перед началом курса лечения. По анамнестическим данным, пациенты не получали терапию как минимум 6 месяцев до госпитализации.

## Методы исследования

1. **Аффинная хроматография:** из исследуемой сыворотки удалены 6 мажорных белков: альбумин, иммуноглобулин G, иммуноглобулин A, антитрипсин, трансферрин и гаптоглобин (Хроматограф фирмы Agilent Technologies 1200).
2. **Концентрирование** до 1 мл с помощью ультрафильтров Amicon Ultra-0,5 (MILLIPORE) на 3 кДа
3. **Вертикальный электрофорез** по методу Laemmli U.K. с использованием 12 %-полиакриламидного геля (Камера: Protean II xi Cell фирмы Bio – Rad, США ).
4. **Трипсинолиз белков** и экстракция пептидов из геля.
5. **ВЭЖХ/масс-спектрометрия** проводилась в ИБМХ РАМН им. Ореховича г. Москва на ESI TOF масс-спектрометре Thermo Scientific Orbitrap LTQ Velos.
4. **Идентификация белков** проводилась путем поиска совпадения значений экспериментальных масс с массами белков, аннотированных в базе данных UniProt при помощи поисковой системы Andromeda (программное обеспечение MaxQuant версии 1.6.3.4). Достоверность результата проверяли t-критерием Стюдента.
5. **Имуноферментный анализ** сыворотки крови:
  - Концентрацию Кадгерина 5 определяли с помощью набора ELISA Kit for Cadherin 5 (CDH5) 96 (Cloud-Clone Corp, США).
  - Концентрацию рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 5 определяли с помощью набора ELISA Kit for VEGF 1 from Homo sapiens (Human)» (Cloud-Clone Corp., США).
  - Достоверность результата проверяли непараметрическим U-критерием Манна-Уитни.



В результате масс-спектрометрического анализа было обнаружено более 1600 белков. Сопоставление индивидуальных протеомов с использованием поисковой системы Andromeda и базы данных UniProt выявило 22 уникальных белка характерных для шизофрении и 20 уникальных белков характерных для БАР, показавших значимые отличия между группами.

## Белки, выявленные в сыворотке больных шизофренией

Код UniProt	Название	Мол. вес, Da	Ген	Функция
Q9NYQ8	Protocadherin Fat 2	479093	FAT2	Клеточная коммуникация
Q02224	Centromereassociated protein E	311897	CENPE	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
P50914	60S ribosomal protein L14	232754	RPL14	Метаболизм белков
Q9UIF8	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2B	220574	BAZ2B	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37	175375	TTC37	Метаболизм нуклеиновых кислот
P42684	Abelson tyrosineprotein kinase 2	128263	ABL2	Клеточная коммуникация
P59923	Zinc finger protein 445	118887	ZNF445	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
P33151	Cadherin	5 87528	CDH5	Рост и развитие клеток, построение межклеточных контактов
P98168	Zinc finger X-linked protein ZXDA	84717	ZXDA	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
Q3ZTT7	SH3- domain binding protein 1 (SH3BP1)	56910	SH3BP1	Клеточная коммуникация и сигнализация
Q75WM6	Testis-specific H1 histone	28116	H1FNT	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
P01011	Alpha-1- antichymotrypsin	25160	SERPINA 3	Метаболизм белков
Q15126	Phosphomevalonate kinase	21995	PMVK	Регуляция метаболизма клеток
Q9BV97	KRAB domaincontaining protein ZNF747	20597	ZNF747	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
P81605	Dermcidin	11277	DCD	Иммунный ответ

Белки, уникально встречающиеся только в сыворотке крови пациентов с шизофренией, участвуют в основном в регуляции метаболизма нуклеиновых кислот, белковом обмене, клеточной коммуникации и иммунном ответе, а также – регулируют клеточный рост.

## Белки, выявленные в сыворотке больных БАР

Код UniProt	Название	Мол. вес, Da	Ген	Функция
Q01484	Ankyrin-2	433448	ANK2	Рост и развитие клеток, построение цитоскелета, стабилизация мембран и ионных каналов.
P49454	Centromere protein F	367537	CENPF	Рост и развитие клеток, регуляция транскрипции и клеточного цикла
P15924	Desmoplakin	331569	DSP	Рост и развитие клеток
P15822	Zinc finger protein 40	297036	HIVEP1	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
Q6UB98	Ankyrin repeat domaincontaining protein 12	235652	ANKRD12 ANCO2	Регуляция транскрипции.
Q9Y566	SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 1	224821	SHANK1	Рост и развитие клеток, стабилизация мембран и ионных каналов, структурная и функциональная организация дендритного шипа и синаптического соединения
O14514	Adhesion G protein-coupled receptor B1	173390	ADGRB1	Иммунный ответ
P17948	Vascular endothelial growth factor receptor 1	150673	FLT1	Клеточная коммуникация
Q01538	Myelin transcription factor 1	122254	MYT1	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
Q9UP95	Solute carrier family 12 member 4	120650	SLC12A4	котранспорт хлорида калия, поддержание клеточного гомеостаза
P55017	Solute carrier family 12 member 3	113066	SLC12A3	котранспорт ионов натрия и хлорида.
O15228	Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase	77138	GNPAT	Дигидроксиацетонфосфатацилтрансфераза
Q9NZI5	Grainyhead-like protein 1 homolog	70070	GRHL1	Регуляция метаболизма нуклеиновых кислот
Q08380	Galectin-3- binding protein	65289	LGALS3BP	Иммунный ответ
Q3SY19	PRSS1 protein	26539	PRSS1	Метаболизм белков

Белки, идентифицированные в сыворотке крови пациентов с БАР, в основном участвуют в регуляции синтеза ДНК и клеточного цикла, особенно в дифференцировке нейрональных клеток-предшественников, развитии нейронов и олигодендроцитов, регулирующие гены кодирующие миелин ассоциированные белки и другие белки ЦНС.

В работе методом иммуноферментного анализа оценивали количество кадгерина-5 и белка рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR 1) в исследуемых группах.

## Содержание VGER1 в сыворотке крови исследуемых групп

Группа	БАР (F31)	Шизофрения			Контроль	Критерий Краскела-Уоллиса, p
		F20.00	F20.01	F20.02		
VEGFR1 пг/мл Me [Q <sub>25</sub> ; Q <sub>75</sub> ]	555,94 [499,12;716,28]	518,1 [358,71; 709,51]	529,62 [362,48; 762,54]	834,23 [683,76; 954,75]	581,66 [478,25; 708,13]	0,0175

При помощи U-критерия Манна-Уитни выявлены статистически значимые отличия в количестве VEGFR1 у больных параноидной шизофренией с эпизодическим типом течения со стабильным дефектом (F 20.02) в сравнении с группой:

- больных с непрерывным типом течения шизофрении (F20.00)  $p=0,01$ ;
- больных шизофренией с нарастающим дефектом (F 20.01)  $p=0,02$ ;
- группой здоровых лиц ( $p=0,038$ ).
- Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR 1) опосредует ангиогенез, нейронную миграцию, нейропротекцию (Shim J.W., 2018) и модулирует синаптическую передачу (McCloskey D.P., 2005).
- Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является маркером сосудистых эндотелиальных клеток.
- Избыточная экспрессия VEGF нарушает внутриклеточный барьер, увеличивает миграцию эндотелиальных клеток, вызывает отек и активирует воспалительный путь.

## Содержание кадгерина-5 в сыворотке крови исследуемых групп.

Группа	Шизофрения (F20.0)	Bipolar disorder	Control	Критерий Краскела-Уоллиса, p
Cadherin 5 ng/ml	2.70 [0.40;5.40]	3.33 [2.04;4,87]	3,03 [2,41;4,84]	0.42

С использованием U-критерия Манна-Уитни были получены достоверные отличия в группе больных шизофренией с ведущей негативной и ведущей позитивной симптоматикой  $p=0,035$ .

## Содержание кадгерина 5 в сыворотке крови больных шизофренией с ведущей позитивной или негативной симптоматикой.

Группа больных шизофренией	с ведущей позитивной симптоматикой	с ведущей негативной симптоматикой	Критерий Манна-Уитни.
Cadherin 5 ng/ml	4.78 [2.71;7.12]	1.86 [0.001;4.11]	$p=0.035$

Кадгерин 5, является маркером эндотелиальной клетки, и снижение его количества в сыворотке крови может указывать на развитие эндотелиальной дисфункции и, как следствие, повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ).

### Заключение

- Таким образом в полученных результатах среди белков, уникально встречающиеся только в сыворотке крови больных шизофренией присутствуют белки цинковых пальцев (Zinc finger protein, Zinc finger X-linked protein ZXDA), которые являются транскрипционными факторами, играющими важную роль в развитии мозга, а также в развитии психических и когнитивных расстройств (Тао R., 2014). Другие идентифицированные белки, такие как: SH3-домен, связывающий белок 1 (SH3BP1), тирозин-протеинкиназа Абельсона 2 и кадгерин-5 осуществляют свои функции с участием актинзависимых белков. В последнее время изменение актина в синапсах связывают с развитием шизофрении и расстройствами аутистического спектра (Bhambhani H.P., 2017).
- Уникальные белки, идентифицированные в сыворотке крови пациентов с БАП, в основном участвуют в регуляции синтеза ДНК и клеточного цикла, такие как центромерный белок F. Кроме того обнаруженный у больных БАП -- SH3 белок содержащий множественные анкириновые повторы (SHAN1) участвует в контактах рецепторов постсинаптической мембраны с актиновым цитоскелетом. Белки с анкириновыми повторами выполняют структурные функции в ЦНС в субклеточных структурах нейронов (начальный сегмент аксона и узлы Ранвье).
- Выявленный у больных БАП рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1 (VEGFR 1) является маркером эндотелиальной дисфункции (Васина Л. В. и др., 2017). sVEGFR-1 (растворимая форма рецептора) связывает фактор роста эндотелия сосудов и ингибирует его митогенную активность для сосудистых эндотелиальных клеток; таким образом, этот растворимый рецептор может действовать как эффективный специфический антагонист фактора роста сосудистых эндотелиальных клеток, что и обуславливает эндотелиальную дисфункцию.
- У больных шизофренией со стабильным дефектом в фазе обострения чаще встречается острый психоз. Таким образом, VEGFR-1 может опосредовать воспалительные эффекты, обычно сопровождающие острый психоз.
- VEGFR-1 может вызывать перераспределение молекулы адгезии кадгерина-5, нарушая его эндотелиальную барьерную функцию. (Park-Windhol C., 2016). Мы так же предполагаем участие этого белка в эндотелиальной дисфункции и нарушении проницаемости ГЭБ у больных БАП
- Дальнейшее изучение выявленных белков, может помочь в раскрытии неясных моментов патогенеза и разработке новых параклинических критериев дифференциальной диагностики.

### ВЫВОДЫ

1. В результате сравнительного протеомного анализа было выявлено 22 уникальных белка характерных для шизофрении и 20 уникальных белков характерных для БАП, которые показали достоверные отличия с другими группами.
2. Количество VEGFR-1 оцененное с помощью ИФА показало статистически значимое различие в группе больных параноидной шизофренией F20.02 при сравнении с группой больных F20.00 ( $p=0,01$ ); с группой больных F20.01 ( $p=0,02$ ) и с группой здоровых лиц ( $p=0,038$ ).
3. Методом ИФА было выявлено статистически значимое снижение содержания кадгерина 5 выворотке крови больных шизофренией с ведущей негативной симптоматикой ( $p=0,035$ ).
4. Статистически значимое увеличение содержания рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 в сыворотке крови больных параноидной шизофренией с эпизодическим типом течения со стабильным дефектом и снижение содержания кадгерина 5 выворотке крови больных шизофренией с ведущей негативной симптоматикой может свидетельствовать о более выраженной эндотелиальной дисфункции у этих больных.

Масс-спектрометрический анализ проводился на базе ЦКП «Протеом Человека» Института биомедицинской химии (ИБМХ) г. Москва.

Работа поддержана грантом РФФИ № 18-15-00053П «Поиск периферических маркёров, ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении» 2018-2020 гг.