

На правах рукописи

ДМИТРИЕВА
Елена Михайловна

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ СЫВОРОТКИ
КРОВИ БОЛЬНЫХ РАССТРОЙСТВАМИ
ШИЗОФРЕНИЧЕСКОГО СПЕКТРА**

1.5.4 – биохимия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
д и с с е р т а ц и и

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск
2021

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте психического здоровья Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Смирнова Людмила Павловна

Официальные оппоненты:

Амстиславская Тамара Геннадьевна, д-р биол. наук, заведующая лабораторией трансляционной биопсихиатрии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины»

Сурин Алексей Константинович, кан.-т. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории биоинформатических и протеомных исследований федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «_____» _____ 2021 года в _____ часов на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций 24.1.242.02 на базе федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», адрес сайта <https://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2021 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Русских Галина Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Шизофрения и расстройства шизофренического спектра являются мультифакториальными заболеваниями, приводящими к стойкому нарушению социальной адаптации и трудоспособности больных в молодом возрасте (Шмуклер А.Б., 2017; Charlson F.J. et al., 2018). Основным препятствием в разработке новых эффективных тактик лечения является отсутствие в диагностических критериях современных сведений об этиологии и патогенезе психических расстройств (Tandon R. et al., 2013; Faiad Y. et al., 2018). Включение панелей биомаркеров в современные критерии диагностики обеспечит объективность диагноза, а также позволит разделить широкие диагностические категории на подгруппы.

Диагностические тесты на основе протеомных биомаркеров будут являться более точной и чувствительной диагностической системой, отвечающей таким требованиям, как воспроизводимость в клинических условиях, экономическая доступность и использование неинвазивных материалов, таких как плазма, сыворотка, моча и слюна (Garcia S. et al., 2016; Martins-de-Souza D., 2019). Учитывая неоднородность симптомов внутри нозологии, биомаркеры могут помочь в стратификации пациентов на основе молекулярных подтипов. Актуальность настоящего исследования определяется необходимостью поиска биологических маркеров психических расстройств в сыворотке крови. Обнаружение и валидация биологических маркеров психических расстройств в сыворотке крови может стать основой для создания дополнительных параклинических методов диагностики психических расстройств, либо способствовать созданию таргетных мишеней для индивидуализации психофармакотерапии, что является одной из важных задач современной фундаментальной медицины и биологической психиатрии.

Степень разработанности темы исследования

В последнее десятилетие повысился интерес к протеомным исследованиям психических расстройств (Haenisch F. et al., 2016; Rodrigues-Amorim D. et al., 2019; Cheng S. et al., 2020; Martins-de-Souza D., 2021). С помощью протеомных исследований у больных шизофренией были обнаружены белки, участвующие в нейрональной передаче и синаптической пластичности (Föcking M. et al., 2021). Многие данные свидетельствуют о том, что аномалии в иммунной системе, отражающиеся в изменении уровней определенных цитокинов в крови, играют роль в патогенезе шизофрении (Presume J. et al., 2017; Ветлугина Т.П., 2020; Laskaris L. et al., 2021; Enache D. et al., 2021). В

крупномасштабном исследовании, направленном на анализ генетических корреляций между протеомом плазмы крови и психическими расстройствами, был выявлен набор кандидатов белков плазмы крови, показывающих ассоциацию с шизофренией (Cheng S. et al., 2020). В последней работе была предпринята попытка разработать панель диагностики развития психотических состояний у лиц с высоким риском психоза (Mongan D. et al., 2020). Авторами описаны доказательства нарушения регуляции каскада комплемента и свертывающей системы. Однако полученные данные невозможно рассматривать в качестве биомаркеров отдельных заболеваний, ввиду динамичности и чувствительности иммунной и свертывающей систем к внешним факторам.

На современном этапе все публикации, посвященные поиску биомаркеров шизофрении, в основном, представлены анализом высокоэкспрессируемых белков сыворотки крови. В мировой литературе представлено крайне ограниченное число публикаций по сравнительному протеомному анализу между отдельными расстройствами шизофренического спектра. К примеру, шизоаффективное расстройство не изучается отдельно, а включается в исследования пациентов с шизофренией с позитивными симптомами (Boerrigter D. et al., 2017; Mahadevan J. et al., 2017).

Таким образом, до сих пор, так и не было выделено ни единичных маркеров, ни диагностических панелей, которые позволили бы стратифицировать пациентов в соответствии с типом молекулярной дисфункции, или в соответствии с поведенческим фенотипом и симптомами заболевания

Цель исследования – проведение сравнительного протеомного анализа сыворотки крови больных шизофренией, расстройствами шизофренического спектра и здоровых лиц, направленного на выявление специфичных белков в каждой исследуемой группе.

Задачи:

1. Провести сравнение протеомных профилей сыворотки крови больных параноидной и простой шизофренией, острым полиморфным психотическим расстройством с симптомами шизофрении, шизотипическим расстройством и здоровых лиц.
2. Установить основные классы белков для каждого изучаемого расстройства.
3. Определить основные биологические процессы и специфичные белки, участвующие в патогенезе шизофрении и расстройств шизофренического спектра.

4. Провести количественную оценку уровней потенциальных белковых маркеров для простой и параноидной шизофрении.

Научная новизна исследования

Впервые определены особенности протеомного профиля для каждой изучаемой патологии: параноидная шизофрения, простая шизофрения, шизотипическое расстройство, острое полиморфное психотическое расстройство с симптомами шизофрении. У больных параноидной и простой шизофренией и шизотипическим расстройством выявлен большой процент достоверных отличий в белковом профиле от профиля здоровых лиц и между группами больных. Наименьшее количество достоверных отличий в белковом профиле контроля было выявлено с больными острым полиморфным психотическим расстройством с симптомами шизофрении.

Впервые выявлены и подробно описаны специфические особенности белковых классов и биологических процессов для каждого изучаемого расстройства, также впервые обнаружена связь ряда нейроспецифичных белков с расстройствами шизофренического спектра.

В сыворотке крови больных как параноидной, так и простой шизофренией в сравнении с группой контроля впервые выявлено достоверное повышение содержания следующих белков: 12-й белок, содержащий анкириновые повторы (ANKRD12), серин/треонин-протеинкиназа DCLK1 (DCLK1), рецепторная серин/треонин-протеинкиназа 1 (RIPK1), при этом максимальное содержание этих белков обнаружено в группе больных простой шизофренией.

Теоретическая и практическая значимость

Данное исследование имеет большое фундаментальное значение. Изучение специфических изменений белкового профиля, характеризующих определенное расстройство шизофренического спектра, будет полезно для выявления особенностей молекулярных механизмов формирования и развития изучаемых расстройств. Впервые представлена подробная биохимическая характеристика белкового профиля расстройств шизофренического спектра в сравнительном аспекте. Выявленные особенности протеома позволят оценить вклад того или иного биохимического механизма в патогенез заболевания.

На основе представленных результатов разработан, получен и внедрен в практику патент РФ № 2569741 «Лабораторный способ диагностики шизотипического расстройства». Разработаны и внедрены в клиническую практику отделения эндогенных расстройств НИИ психического здоровья Томского НИМЦ медицинские технологии:

«Лабораторная диагностика шизотипического расстройства на основе определения количества глутамата в сыворотке крови» и «Лабораторный метод дифференциальной диагностики шизофрении и острого полиморфного психотического расстройства на основе электрофоретического анализа белков сыворотки крови».

На основе полученных результатов по изменению концентраций минорных белков DCLK1, RIPK1 и ANKRD12, показано, что эти белки могут быть использованы, как потенциальные биомаркеры для дифференциальной диагностики психических расстройств.

Использование знаний о протеомных профилях позволит назначать лекарственную терапию с учётом типа молекулярной дисфункции того или иного расстройства, а также послужат основой для разработки новых мишеней для молекулярной таргетной терапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Впервые выявлен высокий уровень значимости различий между протеомными профилями сыворотки крови больных параноидной и простой шизофренией, острым полиморфным психотическим расстройством с симптомами шизофрении, шизотипическим расстройством и здоровых лиц.
2. Определены биологические процессы, характеризующие каждую группу больных: для параноидной шизофрении это процессы трансляции и транскрипции; для простой шизофрении – катаболический метаболизм, межклеточное взаимодействие и везикулярный транспорт; для шизотипического расстройства – рост и развитие нейронов; для острого полиморфного психотического расстройства с симптомами шизофрении – белки клеточной гибели.
3. На роль биологических маркеров простой шизофрении предложены белки DCLK1, RIPK1 и ANKRD12 на основании значимого повышения их концентрации в сыворотке крови.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности результатов, представленных в работе, обоснована достаточным для объективного статистического анализа объемом выборок, применением высокотехнологичных методов исследования и современного чувствительного и точного оборудования, подтверждена адекватными методами статистической обработки.

Результаты проведенных исследований докладывались и обсуждались на российских и международных конференциях: Российский форум с международным участием "Актуальные вопросы фундаментальной медицины" (Екатеринбург, 23-25 октября 2014 г.); VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 12-17 июля

2015 г.); XVI съезд психиатров России (Казань, 23-26 сентября 2015 г.); 9th Central and Eastern European Proteomic Conference (CEEPC) (Poznan, Poland, 15-18 June 2015); “Mental Health, Direction and Challenges” WPA Regional Conference (Tbilisi, 27-30 April 2016); 6th European Conference on Schizophrenia Research: Advancing Research-Promoting Recovery (Германия, Берлин, 14-16 сентября 2017 г.); International Conference «Clinical Proteomics. Postgenome Medicine» (Москва, 30 октября-1 ноября 2017 г.); 4-я Костромская Всероссийская школа молодых ученых и специалистов в области психического здоровья с международным участием (Кострома, 17-19 апреля 2018 г.); 31 ECNP Congress (Barcelona, Spain, 5-6 October 2018); 27th European Congress of Psychiatry (Warsaw, Poland, 6-9 April 2019); XIV Всероссийская Школа молодых психиатров "Суздаль-2019"(Суздаль, 17-22 апреля 2019 г.); 32nd ECNP Congress (Copenhagen, Denmark 7-10 September 2019); II Объединенный научный форум, включающий VI Съезд биохимиков России, VI Съезд физиологов СНГ и XII Съезд иммунологов и аллергологов СНГ совместно с Конгрессом РААКИ (Сочи, 1-6 октября 2019 г.); 28th European Congress of Psychiatry (4-7 July 2020, Madrid); 33rd ECNP, Virtual (12-15 September 2020).

Работа была выполнена при поддержке грантов: Грант РНФ № 14-15-00480 «Поиск ключевых биомаркеров патогенеза социально значимых эндогенных психических расстройств» (2014-2016 гг.); Грант РНФ № 18-15-00053 «Поиск периферических маркёров ассоциированных с нарушением миелинизации головного мозга и патогенезом заболевания при шизофрении» (2018-2020 гг.); Стипендия Президента Российской Федерации (СП-845.2018.4) молодым ученым и аспирантам по теме «Изучение протеомного состава сыворотки крови больных шизофренией» (2018-2020 гг.).

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в разработке плана исследования, в планировании сбора образцов крови от здоровых доноров и пациентов, а также в формировании группы пациентов на основе данных клинического обследования, проведенного врачами-психиатрами отделения эндогенных расстройств НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Автор лично выполнила весь лабораторный блок исследования, включая пробоподготовку, обработку данных масс-спектрометрического анализа и статистический анализ результатов.

Публикация результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 39 печатных работ, из которых: 5 статей в центральных рецензируемых журналах,

рекомендованных ВАК РФ; одна статья в международной печати; 1 патент на изобретение РФ, 2 медицинские технологии.

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 188 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списка использованной литературы, приложений. Работа иллюстрирована 41 таблицей и 6 рисунками. Библиографический указатель включает 449 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Комплексное исследование было выполнено на базе НИИ психического здоровья Томского национального исследовательского медицинского центра (директор – академик РАН, профессор, д-р мед. наук, заслуженный деятель науки РФ Н.А. Бохан). Формирование групп пациентов для исследования и клиническая верификация диагноза выполнена в клиниках НИИ психического здоровья на базе отделения эндогенных расстройств (руководитель отделения – д-р мед. наук, профессор А.В. Семке). Экспериментальная часть исследования проводилась на базе лаборатории молекулярной генетики и биохимии НИИ психического здоровья (руководитель лаборатории – д-р мед. наук, профессор С.А. Иванова). Масс-спектрометрический анализ проводился на базе центра коллективного пользования «Протеом человека» (руководитель – к.б.н. О.В. Тихонова) в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» г. Москва (директор – д.б.н. Е.А. Пономаренко).

Пациенты

Критерии включения пациентов: лица мужского и женского пола в возрасте от 18 до 55 лет; клинически верифицированный врачами-психиатрами диагноз, установленный по критериям МКБ-10; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии включения здоровых лиц: идентичность по полу и возрасту исследуемой группе пациентов; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании.

Критерии не включения для всех лиц: возраст младше 18 и старше 55 лет; наличие острых и обострение хронических инфекционных, воспалительных, аутоиммунных заболеваний на момент обследования; прием психоактивных веществ; наличие у пациента коморбидных психических и неврологических заболеваний.

Всего в рамках исследования обследовано 170 человек. Среди них 90 пациентов с расстройствами шизофренического спектра, 29 пациентов с биполярным аффективным расстройством и 51 здоровый донор. Между группами не выявлено статистически значимых отличий по распределению возраста, что отражает их однородность. Группа пациентов с расстройствами шизофренического спектра представлена пациентами со следующими диагнозами: параноидная шизофрения (F20.0) (возраст 31,0 [25,5;41,5] лет, длительность заболевания 4,0 [1,0;10,0] лет); простая шизофрения (F20.6) (возраст 35,0 [27,0;49,0] лет, длительность заболевания 12,5 [6,5;17,0] лет); шизотипическое расстройство (F21) (возраст 19,0 [19,0;21,0] лет, длительность заболевания 2,5 [2,0;4,0] лет); острое полиморфное психотическое расстройство с симптомами шизофрении (F23.1) (возраст 24,0 [22,0;27,5] лет, длительность заболевания 0,03 [0,02;0,27] лет). Группа пациентов с биполярным аффективным расстройством (F31) включена в исследование на этапе количественной оценки белка ANKRD12 в качестве группы сравнения (возраст 9,0 [5,0;16,0] лет, длительность заболевания 9,0 [5,0;16,0] лет).

Методы исследования. В качестве основного материала биохимических исследований использовалась сыворотка крови. Кровь брали согласно стандартной процедуре из локтевой вены в пробирку с активатором образования сгустка SiO₂ (Becton Dickinson Vacutainer, Netherlands), кровь забирали натощак. У пациентов кровь брали до назначения лекарственной терапии. Для обогащения низкокопийных белков проводили аффинную хроматографию на хроматографической колонке Multiple Affinity Removal Column Human-14 4.6 x 100 mm (Agilent, USA), предварительно образцы сыворотки 3-кратно разводили натрий-фосфатный буфером (Phosphate buffered saline, PBS). Полученные образцы разделяли с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле по методу Laemmli (Laemmli U., 1970), с окрашиванием красителем Coomassi Brilliant Blue G250 (0,1% Coomassi Brilliant Blue G250; 40% C₂H₅OH; 10% CH₃COOH).

Каждый образец подвергали протеолитическому расщеплению трипсином в геле Sequencing Grade Modified Trypsin (Promega, USA). Реакцию трипсинолиза проводили в течение 18 часов при 37°C. После экстракции пептидов из геля, супернатант отбирали в пробирки типа эппендорф и высушивали на вакуумном концентраторе Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf, Germany).

Полученные образцы пептидов анализировали с использованием высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent серии 1100 (Thermo Fisher Scientific, USA), соединенного с гибридным квадрупольным масс-спектрометром с Фурье-преобразованием Orbitrap

Q-exactive HF и LTQ Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, USA). Разделение пептидов проводили на колонке с обращённой фазой RP-HPLC Zorbax 300SB-C18. Масс-спектры получали в режиме положительных ионов с разрешением 30000 (нормировано на m/z 400) для MS и 7500 (нормировано на m/z 400) для MS/MS сканирования. Идентификацию белков проводили с использованием программного обеспечения Mascot Ver. 2.1 (Matrix Science, USA).

Измерение абсолютной концентрации белков в образцах сыворотки крови человека проводилось методом мониторинга выбранных реакций (Selected Reaction Monitoring, SRM) на тройном квадрупольном масс-спектрометре TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, USA) с использованием синтетических пептидных стандартов с включением стабильных изотопов углерода ^{13}C и азота ^{15}N . Хроматографический анализ выполняли с помощью нано-поточковой хроматографической системы Dionex UltiMate 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific, USA). Смесь гидролизата сыворотки крови и синтетических пептидных стандартов, меченных стабильными изотопами в объеме 1 мкл загружали на обогащающую колонку Zorbax 300SB-C18. Целевой масс-спектрометрический анализ выполняли на тройном квадрупольном масс-спектрометре TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, USA) в режиме мониторинга селективных реакций (SRM). Для определения количества белка соотношение, рассчитанное в Skyline, перемножали на известное содержание каждого стандарта. Данные количественной масс-спектрометрии обрабатывались в автоматическом режиме в программном обеспечении QuanBrowser Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Scientific, USA).

Количественная оценка ANKRD12 проводилась методом непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора ELISA Kit for Ankyrin repeat domain-containing protein 12 from Homo sapiens (Human) (Cloud-Clone Corp., USA).

Биоинформатический анализ и статистическая обработка.

Анализ белок-белковых взаимодействий и идентификация задействованных биологических путей проводилась с использованием инструментов биоинформатики: база данных известных и предсказанных белок-белковых взаимодействий STRING (<https://string-db.org/>) (Szklarczyk D. et al., 2019); базы биологических путей и их взаимодействий Reactome (<https://reactome.org/>) (Jassal B. et al., 2020); базы Gene Ontology (<http://geneontology.org/>) (Gene Ontology Consortium, 2021); базы данных ассоциаций генов и болезней DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) (Piñero J. et al., 2020).

Для работы с базами Gene Ontology и Reactome использовался инструмент ПАНТЕРА (PANTHER, Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) (<http://pantherdb.org/>) (Mi H. et al., 2019).

Для проведения статистической обработки полученных результатов использовали пакет стандартных прикладных программ «STATISTICA» версии 10.0 для Windows и статистическую среду R (<http://www.r-project.org>).

Результаты

1. Особенности протеомного профиля больных расстройствами шизофренического спектра

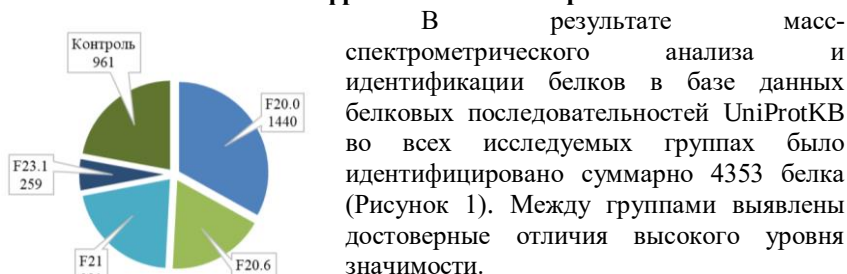


Рисунок 1 – Диаграмма распределения идентифицированных белков между исследуемыми группами

Проведен статистический анализ различий между белками групп расстройств шизофренического спектра и белками группы контроля. Для анализа качественных признаков с малыми частотами использовался точный тест Фишера с поправкой Йетса (Таблица 1).

Данный подход к обработке результатов позволил включить в статистическую обработку низкокопийные нейроспецифичные белки, находящиеся в сыворотке крови в низких концентрациях.

Таблица 1 – Достоверность отличий протеомов расстройств шизофренического спектра при сравнении с контролем

	Белки групп расстройств шизофренического спектра	Критерий Фишера, <i>p</i>
Контроль – F20.0	1113	9,67E-09
Контроль – F20.6	589	9,65E-05
Контроль – F21	678	0,0006
Контроль – F23.1	100	0,00635

У больных параноидной и простой шизофренией и шизотипическим расстройством выявлен большой процент достоверных отличий в белковом профиле от профиля здоровых лиц. Наименьшее

количество достоверных отличий в профиле белков выявлено у больных ОППР. Очевидно, что наименьшее количество различий обусловлено небольшой длительностью заболевания и минимальными патогенетическими изменениями в организме больных.

Следующий этап анализа заключался в сравнении протеомов между изучаемыми группами. В данном сравнении из белковых профилей исследуемых групп не исключались белки, присутствующие в контрольной группе.

Таблица 2 – Достоверность отличий протеомов расстройств шизофренического спектра при межгрупповом сравнении

Группы сравнения	Белки групп расстройств шизофренического спектра	Критерий Фишера, p
F20.0 F20.6	1125 457	0,0008
F20.0 F21	869 350	3,20E-12
F20.0 F23.1	1302 121	0,006
F20.6 F21	522 671	0,016
F20.6 F23.1	630 117	5,35E-09
F21 F23.1	802 140	2,06E-06

В Таблице 2 приведены результаты межгруппового сравнения

протеомных профилей.

При сравнении протеомных профилей сыворотки крови всех исследуемых групп между собой также получены достоверные отличия высокого уровня значимости. При этом максимальный уровень различий выявлен между протеомным профилем больных параноидной шизофренией и шизотипическим

расстройством, а минимальный – между больными простой шизофренией и шизотипическим расстройством, что является отражением в первом случае сходства, а во втором – различия клинических и патогенетических картин.

Для дальнейшей оценки различий в протеомных профилях исследуемых групп были выбраны белки, встречающиеся только у больных одним расстройством и не встречающиеся у здоровых лиц. Уникальные белковые спектры формировались путем симметричного сравнения протеомных профилей всех пяти групп с удалением общих белков.

С помощью программы PANTHER были определены основные функциональные классы белков для каждого исследуемого расстройства. Для больных параноидной шизофренией характерны основные классы белков, отвечающие за процессы трансляции и транскрипции (около 200 белков); для группы простой шизофрении –

белки рецепторного аппарата, внеклеточного матрикса и везикулярного транспорта (около 100 белков); для больных шизотипическим расстройством – белки-шапероны, являющиеся уникальными для данного вида расстройства и метаболические ферменты (75 белков); для острого полиморфного психотического расстройства (ОППР) – белки метаболизирующие нуклеиновые кислоты. Проведенный анализ позволяет предположить, что у больных параноидной шизофренией преобладают процессы репарации, что и обуславливает возможность ремиссии у данной группы пациентов. Белковые классы, преобладающие в сыворотке крови больных простой шизофренией, вероятно, говорят о более тяжелом течении патологического процесса, отражающемся на клеточном уровне. Шизотипическое расстройство, отличающееся присутствием такого класса белков, как шапероны, которые появляются при реакции организма на экстремальное воздействие, говорит в первую очередь об адаптационных способностях организма при этом расстройстве. Реакция организма на психогенный стресс, при остром психозе, также характеризуется классом белков, выявленных у больных ОППР.

Для детального анализа белков каждой группы больных были определены биологические процессы с использованием международной программы PANTHER™ GO slim.

У больных параноидной шизофренией основная часть выявленных белков задействована в процессах биосинтеза, клеточного транспорта и расположением органелл внутри клетки, то есть в формировании клеточной структуры (Таблица 3). Большая группа белков задействована в процессах синтеза, функционирования и регуляции актинового цитоскелета, в регуляции процессов трансляции и транскрипции. Среди наиболее интересных специфичных белков для параноидной шизофрении следует отметить кинезиноподобный белок KIF17 (Q9P2E2), который транспортирует везикулы, содержащие субъединицу NMDA рецептора; связанный с Ras белок Rab-10 (P61026), который обеспечивает аксональный транспорт, и белки, участвующие в росте нейритов и нейронов.

Таблица 3 – Биологические процессы, характеризующие значимые белки в сыворотке крови больных параноидной шизофренией (PANTHER)

Группы биологических процессов		Количество процессов	ID процесса
Метаболические процессы	Биосинтез макромолекул	2	GO:0034645
	Макромолекулярные процессы	4	GO:0043170
	Метаболизм нуклеиновых кислот	8	GO:0090304

	Метаболизм азотных соединений	11	GO:0006807
Клеточные процессы	Пролиферация клеток	1	GO:0008283
	Сборка вакуолей	1	GO:0007033
	Внутриклеточный транспорт органелл и структур	3	GO:0046907
	Организация хромосом	4	GO:0051276
	Организация актинового цитоскелета	5	GO:0030036
	Транспорт белков в клетке	5	GO:0034613
	Рибосомальный биосинтез	6	GO:0042254
	Сборка клеточных компонентов	7	GO:0022607
	Организация клеточных компонентов	10	GO:0016043
Регуляция биологических процессов	Регуляция метаболизма амидов	1	GO:0034248
	Регулирование размера клеточных компонентов	2	GO:0032535
	Регуляция внутриклеточной передачи сигналов	2	GO:0035556
	Регуляция метаболизма РНК	2	GO:0051252
	Регуляция организации хроматина	2	GO:1902275
	Регуляция апоптоза	2	GO:0043067
	Регуляция белкового метаболизма	4	GO:0051246
	Регуляция полимеризации актиновых филаментов	4	GO:0030838
	Регуляция актинового цитоскелета	6	GO:0032956
	Регуляция организации клеточных органелл	6	GO:0051128
	Регуляция экспрессии генов	7	GO:0010468

Значительная часть белков, характеризующих группу больных простой шизофренией относится к белкам, регулирующим основные метаболические и транспортные процессы в клетке (Таблица 4). В отличие от группы параноидной шизофрении, в которой преобладают процессы анаболизма, белки больных простой шизофренией участвуют основном в процессах катаболизма. Активно протекающими процессами, как при простой, так и при параноидной шизофрении, оказались процессы внутриклеточного транспорта и распределения

органелл, рост и развитие нейронов. Однако для группы простой шизофрении большая часть транспортных белков опосредует передачу сигнальных молекул между клетками, рецепторную передачу и ее регуляцию. Наиболее интересными из них являются белки, регулирующие работу глутаматных рецепторов, к примеру, субъединица гамма-2 потенциал-зависимого кальциевого канала (Q9Y698), регулирующего AMPA рецептор или субъединицы потенциал-зависимого кальциевого канала, и кальций-связывающий белок участвующий в высвобождении нейромедиатора - активатор кальций зависимой секреции 2 (Q86UW7). Ещё одним интересным и перспективным белком для простой шизофрении является 12-й белок, содержащий анкириновые повторы (Ankyrin repeat domain-containing protein 12, ANKRD12), предполагаемой функцией которого является участие в регуляции гистоновых деацетилаз. Кроме него, для дальнейшего изучения количественных изменений концентраций были выбраны рецепторная серин/треонин-протеинкиназа 1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIPK1) и серин/треонин-протеинкиназа DCLK1 (Serine/threonine-protein kinase DCLK1, DCLK1).

Таблица 4 – Биологические процессы, характеризующие значимые белки в сыворотке крови больных простой шизофренией (PANTHER)

Группы биологических процессов		Количество процессов	ID процесса
Метаболические процессы	Катаболизм макромолекул	1	GO:0009057
Клеточные процессы	Движение клеток	1	GO:0006928
	Цитоскелет-зависимый внутриклеточный транспорт	2	GO:0030705
	Клеточный цикл	2	GO:0022402
	Локализация белков в клетке	3	GO:0070972 GO:1990778
	Везикулярный транспорт	5	GO:0016192
	Организация клеточных компонентов	8	GO:0016043
Регуляция биологических процессов	Регуляция клеточной адгезии	1	GO:0031589
	Регуляция ответа на раздражитель	1	GO:0061041
	Отрицательная регуляция каталитической активности ферментов	1	GO:0043086
	Положительная регуляция метаболических процессов	1	GO:0009893
	Регуляция передачи	3	GO:0009966

	сигналов в клетке		GO:0007165
	Регуляция активности липаз	3	GO:0060191
	Регуляция транспорта	4	GO:0051049
	Регуляция активности фосфолипаз	5	GO:0010517
	Регуляция иммунного ответа	9	GO:0050776

Белки в группе больных шизотипическим расстройством в большинстве представляют анаболические процессы и, тем самым, обеспечивают высокую синтетическую активность клетки. Часть метаболических процессов совпадают с аналогичными у больных параноидной шизофренией, но представлены большим разнообразием, к примеру наличием синтеза пуриновых оснований. Белки, характеризующие клеточные процессы у больных шизотипическим расстройством, представлены главным образом транспортом везикул в синапсе, формированием синаптических окончаний и процессами нейрогенеза. Кроме того, выявлены белки шапероны, не встречающиеся в других группах. Обнаруженные у этих больных регуляторные белки регулируют дифференцировку нейронов, активность глутаматных рецепторов, синаптическую передачу сигналов. Среди них наиболее интересны такие белки как: нейролигин-1 (Q8N2Q7), участвующий в начальном формировании синаптических окончаний, семафорин-5А (Q13591) участвует в направленном росте аксонов и регулирует ангиогенез, белок shisa-8 (B8ZZ34) регулирует активность AMPA рецептора. У больных шизотипическим расстройством так же, как и в группе простой шизофрении, встречаются белки, содержащие анкириновые повторы (11-й белок, содержащий анкириновые повторы, Q6UB99). Нейроспецифичные белки у больных шизотипическим расстройством, вероятно, обеспечивают нейропластичность у этой группы больных.

Биологические процессы, представленные для группы острого полиморфного психотического расстройства, существенно отличаются от белков, характеризующих процессы всех остальных групп. У этой группы больных выявлено всего 4 нейроспецифичных белка. Наиболее интересные из них: белок натрий-зависимый переносчик дофамина (Q01959) обеспечивает связывание дофамина в синаптической щели и транспортировку в пресинаптическое окончание; белок Ras / Rap белок, активирующий ГТФ-азу SynGAP (Q96PV0) является частью сигнального комплекса NMDA рецептора в возбуждающих синапсах, белок, содержащий домен BTB / POZ, KCTD11 (Q693B1) является регулятором нейрогенеза и дифференцировки нейронов. У больных ОППР выявлено большое количество процессов, участвующих в

клеточной гибели, включая апоптоз нейронов. Однако встречаются и белки, связанные с процессом миелинизации и организацией хромосом. Все эти процессы обуславливают острое воспаление, которое характеризует острый психоз при ОППР.

Для анализа межбелковых взаимодействий была использована база STRING. Для дальнейшего изучения количественных изменений наиболее интересных в патогенетическом отношении белков, были выбраны белки, показавшие максимальное score (0,7-0,9) при анализе межбелковых взаимодействий. Такими белками оказались: 12-й белок,

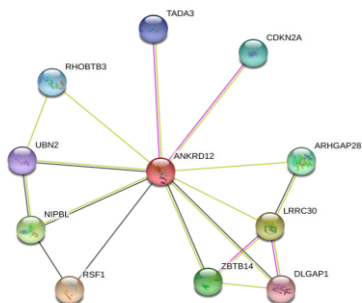


Рисунок 2 – Сеть белок-белковых взаимодействий первого порядка для белка ANKRD12

содержащий анкириновые повторы (Ankyrin repeat domain-containing protein 12, ANKRD12), рецепторная серин/треонин-протеинкиназа 1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1, RIPK1), серин/треонин-протеинкиназа DCLK1 (Serine/threonine-protein kinase DCLK1, DCLK1).

ANKRD12 взаимодействует с белками, регулирующими серотониновую и дофаминовую

нейротрансмиссию (Рисунок 2).

Белок DCLK1 имеет высокий уровень значимости взаимодействий с белками, регулируемыми

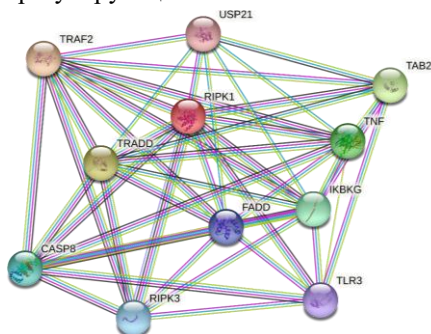


Рисунок 4 – Сеть белок-белковых взаимодействий первого порядка для белка RIPK1

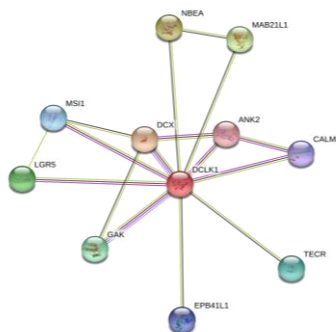


Рисунок 3 – Сеть белок-белковых взаимодействий первого порядка для белка DCLK1

нейротрансмиссию через глутаматные и ГАМК рецепторы, что также связано с патогенезом шизофрении (Рисунок 3).

Сеть взаимодействий для белка RIPK1 отражает функциональную связь между белками, участвующими в процессах апоптоза и некроптоза, которые являются процессами, запускаемыми в ответ на воспаление. Часть из представленных белков опосредует эти процессы в нейронах головного мозга (Рисунок 4).

2. Содержание таргетных белков у больных шизофренией

2.1. Содержание белка DCLK1 у больных шизофренией и здоровых лиц

Серин/треонин-протеинкиназа DCLK1 является членом суперсемейства даблкортина (DCX) и суперсемейства протеинкиназ (Reiner O. et al., 2006) Ген *Dclk1* кодирует белок, который обеспечивает полимеризацию микротрубочек и участвует в нейрогенезе и пластичности нейронов, регулируя разрастание дендритов и образование синапсов (Shin E. et al., 2013). Более того, модификации *Dclk1* уже связаны с психическими расстройствами (Håvik B. et al., 2012; Wu J.Q. et al., 2012).

Корреляционный анализ по Спирмену не выявил зависимости между содержанием белка DCLK1 с возрастом во всех обследуемых группах, и показал наличие зависимости между концентрациями DCLK1 и длительностью заболевания в группе больных ($r=0,44$, $p=0,031$). Концентрация DCLK1 в сыворотке крови в общей группе больных шизофренией была увеличена в 3 раза в сравнении со здоровыми лицами.

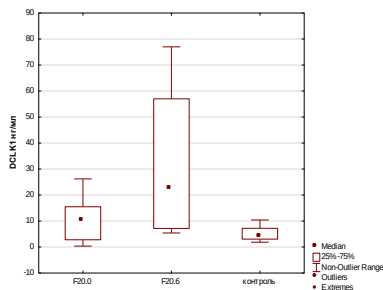


Рисунок 5 – Концентрация DCLK1 в сыворотке крови в группах параноидной, простой шизофрении и здоровых лиц

При изучении уровня данного белка в сыворотке крови больных параноидной и простой шизофренией было показано, что основной вклад в достоверность различий ($p=0,01$) вносят показатели концентрации у пациентов с простой шизофренией, показавшие шестикратное увеличение его содержания в сравнении со здоровыми лицами (Рисунок 5). Различия в уровнях концентрации DCLK1 у больных простой и параноидной шизофренией также были достоверными ($p=0,037$).

Корреляционный анализ исключил влияние возрастных факторов, на концентрацию DCLK1 в группах больных параноидной и

простой шизофренией, однако выявил наличие прямой связи средней силы ($r=0,442$, $p=0,031$) с длительностью заболевания в группе параноидной шизофрении. Это можно объяснить, как вкладом данного белка в усиление влияния патологических процессов на организм в процессе развития заболевания, так и результатом влияния терапии (Zygmunt M. et al., 2018).

2.2. Содержание белка RIPK1 у больных шизофренией и здоровых лиц

Серин/треонин протеинкиназа 1 является ключевым регулятором TNF-опосредованного апоптоза, некроптоза и воспаления (Yuan, J. et al., 2019). Активация RIPK1 и процессы некроптоза могут представлять собой патологический механизм, участвующий в гибели клеток в процессе воспаления.

Анализ содержания RIPK1 в исследуемых группах в зависимости от возраста и длительности заболевания статистически значимых различий не показал. Корреляционный анализ также не выявил зависимостей между содержанием белка RIPK1 с возрастом во всех обследуемых группах, и длительностью заболевания в группах больных.

Анализ уровня концентрации RIPK1 в сыворотке крови показал двадцатикратное увеличение в общей группе больных шизофренией в сравнении со здоровыми лицами ($p=0,009$).

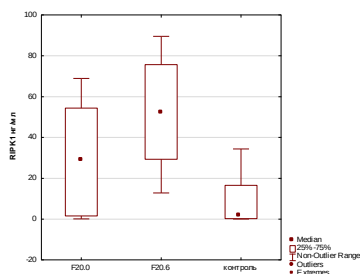


Рисунок 6 – Концентрация RIPK1 в сыворотке крови в группах параноидной, простой шизофрении и здоровых лиц

Различия в концентрации RIPK1 между группами параноидной шизофрении, простой шизофрении и здоровыми лицами также были достоверными (Рисунок 6). Корреляционный анализ исключил влияние половых и возрастных факторов на концентрацию RIPK1 в группах больных параноидной и простой шизофренией. Белок RIPK1 специфично запускает апоптоз в нейронах в ответ на увеличение провоспалительных цитокинов. Связь данного белка с шизофренией установлена впервые.

3. 12-й белок, содержащий анкириновые повторы, как лабораторный маркер простой шизофрении

Белок ANKRD12 ингибирует транскрипционную активность генов посредством взаимодействия с гистондеацетилазами (HDAC). В постмортальных исследованиях мозга больных шизофренией была выявлена повышенная экспрессия HDAC1 в префронтальной коре и гиппокампе. Увеличение их активности может являться причиной когнитивных нарушений и негативной симптоматики (Sharma R.P. et al., 2008; Lo-Castro A. et al., 2013). Анализ содержания ANKRD12 в исследуемых группах в зависимости от возраста и длительности заболевания статистически значимых различий не показал. Корреляционный анализ по Спирмену не выявил зависимостей между содержанием белка ANKRD12 с возрастом во всех обследуемых группах, и длительностью заболевания в группах больных.

Сравнение уровней ANKRD12 в сыворотке крови у групп контроля и БАР не выявило достоверных различий ($p=0,55$). Однако при сравнении групп шизофрения/контроль ($p=0,03$) и групп БАР/шизофрения ($p=0,006$) было обнаружено достоверное повышение концентраций ANKRD12.

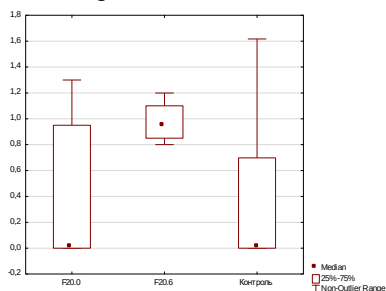


Рисунок 7 – Концентрация RIPK1 в сыворотке крови в группах параноидной, простой шизофрении и здоровых лиц

Также выявлено значимое повышение уровня ANKRD12 у больных простой шизофренией по сравнению с уровнем больных параноидной шизофренией ($p=0,0007$) и у здоровых лиц ($p=0,04$) (Рисунок 7). Корреляционный анализ исключил влияние возрастных факторов, а также длительности заболевания на концентрацию 12-го белка, содержащего анкириновые повторы в группах больных параноидной и простой шизофренией.

В группе пациентов с параноидной шизофренией оценивалось влияние ведущей симптоматики на концентрацию ANKRD12 в сыворотке крови с целью оценить вклад негативной симптоматики в достоверность полученных значений. В ходе проверки не было выявлено достоверных изменений в концентрациях между группами ($p=0,27$). Медианы в группе параноидной шизофрении представлены значениями 0,01 [0,01;1,06] нг/мл для негативной и 0,01 [0,01;0,95] нг/мл для позитивной симптоматики. Из полученных данных можно

сделать вывод, что ANKRD12 может представлять собой лабораторный маркер для простой формы шизофрении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате исследования доказано наличие достоверных различий в протеомных профилях сыворотки крови больных расстройствами шизофренического спектра. Выявлены особенности биологических процессов, определяемых белками характерными для каждого изучаемого расстройства. В протеомных профилях расстройств шизофренического спектра выделены нейроспецифичные белки, которые могут отражать процессы, происходящие в головном мозге. Количественными методами анализа выявлено значимое увеличение концентрации белков ANKRD12, RIPK1 и DCLK1 в сыворотке крови больных простой шизофренией, что доказывает их вклад в патологические и биохимические процессы при шизофрении. Все три изученных белка претендуют на роль биомаркеров простой шизофрении. Полученные данные в дальнейшем могут послужить основой создания новых таргетных мишеней для лекарственной терапии.

ВЫВОДЫ

1. Сравнение протеомных профилей сыворотки крови больных параноидной и простой шизофренией, острым полиморфным психотическим расстройством с симптомами шизофрении (ОППР), шизотипическим расстройством и здоровых лиц показало высокий уровень значимости различий между всеми исследуемыми группами, с наименьшими отличиями между больными ОППР и здоровыми лицами.
2. Основные классы белков для параноидной шизофрении – белки трансляции и транскрипции; для простой – белки рецепторного аппарата, экстрацеллюлярного матрикса и везикулярного транспорта; для шизотипического расстройства – белки шапероны и метаболические ферменты; для ОППР – белки, метаболизирующие нуклеиновые кислоты.
3. Определены основные биологические процессы для каждого изучаемого расстройства:
 - для больных параноидной шизофренией это белки биосинтеза, формирующие клеточную структуру; белки, регулирующие активный цитоскелет, и процессы трансляции и транскрипции, в том числе и в нейритах и нейронах;
 - для больных простой шизофренией это белки, регулирующие метаболические (катаболические) и транспортные процессы в

клетке (рецепторная передача и передача сигнальных молекул, нейромедиаторов);

- для больных шизотипическим расстройством это белки в основном анаболических процессов, специфичные белки-шапероны, регуляторные белки дифференцировки нейронов и нейротрансмиссии;
 - для больных острым полиморфным психотическим расстройством с симптомами шизофрении – белки клеточной гибели, белки, регулирующие миелинизацию и организацию хромосом.
4. Для белков DCLK1, RIPK1 и ANKRD12 выявлено значимое увеличение концентрации в сыворотке крови у больных простой шизофренией по сравнению с параноидной шизофренией и контрольной группой.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Дмитриева Е.М.** Анализ различий в электрофоретическом распределении белков сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц / **Е.М. Дмитриева**, Л.П. Смирнова, Л.В. Логинова, А.А. Серегин, Е.Г. Дмитриева, С.А. Иванова // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2014. – Т. 3, № 49. – С. 209-210.
2. Смирнова Л.П. Первые результаты сравнения протеомов сыворотки крови больных шизофренией и биполярным аффективным расстройством / Л.П. Смирнова, Л.В. Логинова, **Е.М. Дмитриева**, А.А. Серёгин, А.В. Семке, Г.Г. Симуткин, С.А. Иванова // **Сибирский вестник психиатрии и наркологии.** – 2016. – Т. 2, № 91. – С. 42-47.
3. Смирнова Л.П. Результаты поиска биомаркеров шизофрении / Л.П. Смирнова, Д.А. Паршукова, Е.А. Ермаков, **Е.М. Дмитриева**, А.С. Бойко, О.Ю. Федоренко, Л.В. Логинова, Н.М. Кротенко, А.А. Серёгин, А.А. Летова, Л.Е. Синянский, Е.Г. Корнетова, С.А. Иванова // **Сибирский вестник психиатрии и наркологии.** – 2018. – Т. 2, № 99. – С. 33-43.
4. L. Smirnova. The difference in serum proteomes in schizophrenia and bipolar disorder / L. Smirnova, A. Seregin, I. Boksha, **E. Dmitrieva**, G. Simutkin, E. Kornetova, O. Savushkina, A. Letova, N. Bokhan, S. Ivanova, V. Zgoda // **BMC Genomics.** – 2019. – Vol. 20, Suppl 3. – P. 535. (Web of Science Q1, Scopus Q1)

5. Смирнова Л.П. Содержание рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1 в сыворотке больных параноидной шизофренией и аффективными расстройствами / Л.П. Смирнова, А.А. Серегин, **Е.М. Дмитриева**, С.Н. Васильева, А.В. Семке // **Сибирский вестник психиатрии и наркологии**. – 2019. – Т. 4, № 105. – С. 12-18.
6. Серегин А.А., Глутамат в сыворотке крови больных с расстройствами шизофренического спектра и биполярным аффективным расстройством / А.А. Серегин, Л.П. Смирнова, **Е.М. Дмитриева**, С.Н. Васильева, А.В. Семке, С.А. Иванова // **Психиатрия**. – 2020. – Т. 18, №3. – С. 22-31.

Патент на изобретение

7. Патент РФ № 2569741. Лабораторный способ диагностики шизотипического расстройства / Л.П. Смирнова, Л.В. Логинова, С.А. Иванова, **Е.М. Дмитриева**, А.А. Серегин, А.В. Семке, Н.А. Бохан // Бюл. №33, 2015г. Официальная заявка. Опубликовано 27.11.2015г.

Медицинские технологии

8. Смирнова Л.П. Лабораторный метод дифференциальной диагностики шизофрении и острого полиморфного психотического расстройства на основе электрофоретического анализа белков сыворотки крови: Медицинская технология / Л.П. Смирнова, Л.В. Логинова, А.А. Серегин, Е.Г. Корнетова, **Е.М. Дмитриева**, А.А. Летова, А.В. Семке, С.А. Иванова – Томск: «Иван Федоров», 2016. – 23 с.
9. Смирнова Л.П. Лабораторная диагностика шизотипического расстройства на основе определения количества глутамата в сыворотке крови: Медицинская технология / Л.П. Смирнова, Л.В. Логинова, С.А. Иванова, **Е.М. Дмитриева**, А.А. Серегин, А.А. Летова, А.В. Семке, Н.А. Бохан. – Томск: «Иван Федоров», 2015. – 20 с.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность и благодарность руководителю лаборатории системной биологии и отдела протеомных исследований и масс-спектрометрии ИБМХ им. В.Н. Ореховича, г. Москва, профессору РАН, д.б.н. Згоде В.Г., к.б.н. Мойса А.А., к.б.н. Новиковой С.Е. того же института за помощь, оказанную при проведении масс-спектрометрии образцов сыворотки крови исследованных лиц, а также центру коллективного пользования «Протеом человека».