

УДК 616.895.8:57.083.3

Для цитирования: Смирнова Л.П., Паршукова Д.А., Ермаков Е.А., Дмитриева Е.М., Бойко А.С., Федоренко О.Ю., Логинова Л.В., Кротенко Н.М., Серёгин А.А., Летова А.А., Синянский Л.Е., Корнетова Е.Г., Иванова С.А. Результаты поиска биомаркеров шизофрении. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2018; 2 (99): 33–44. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-2\(99\)-33-44](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-2(99)-33-44)

## Результаты поиска биомаркеров шизофрении

Смирнова Л.П.<sup>1</sup>, Паршукова Д.А.<sup>1</sup>, Ермаков Е.А.<sup>2</sup>, Дмитриева Е.М.<sup>1</sup>,  
Бойко А.С.<sup>1</sup>, Федоренко О.Ю.<sup>1</sup>, Логинова Л.В.<sup>1</sup>, Кротенко Н.М.<sup>1,3</sup>,  
Серёгин А.А.<sup>1</sup>, Летова А.А.<sup>3</sup>, Синянский Л.Е.<sup>3</sup>, Корнетова Е.Г.<sup>1,3</sup>, Иванова С.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (НИИ психического здоровья Томский НИМЦ) Россия, 634014, Томск, ул. Алеутская, 4

<sup>2</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Россия, 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8

<sup>3</sup> Сибирский государственный медицинский университет Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2

### РЕЗЮМЕ

В результате комплексного исследования ряда показателей сыворотки крови больных шизофренией выявлено достоверное повышение концентрации глутамата, кортизола, глиального белка S100B, антител к основному белку миелина, нуклеарной фракции молекул средней массы (МСМ), ДНК-гидролизующей активности IgG на фоне выраженного снижения нейростероидов дегидроэпиандростерона (ДГЭА) и дегидроэпиандростерона сульфата (ДГЭАС), ароматической фракции МСМ, антител (АТ) к однонитевой ДНК, окисленного глутатиона. Мозговой нейротрофический фактор и активность ДНК-гидролизующих антител показали положительную корреляцию с ведущими позитивными симптомами у пациентов с шизофренией. Такие факторы, как ведущая негативная симптоматика и длительность заболевания более 3 лет, напротив, вызывают у этих пациентов однонаправленные изменения, которые выражаются в снижении концентрации стероидного нейропротектора ДГЭАС, окисленного глутатиона и АТ к однонитевой ДНК. Методом протеомного анализа выявлены 4 неспецифических белка, характеризующих патогенетические изменения при шизофрении.

**Ключевые слова:** шизофрения, периферические биомаркеры, нейростероиды, каталитические антитела.

### ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения относится к социально значимым расстройствам, для которого этиология и точные патофизиологические механизмы до настоящего времени не известны. Превалирующая моноаминовая (дофаминовая) теория не объясняет в полной мере патогенез заболевания. Кроме того, ответ на терапию современными антипсихотическими препаратами дают лишь 60% пациентов, что говорит о необходимости поиска новых подходов к изучению патогенеза шизофрении.

В основе нашего исследования лежит идея о мультифакториальности и гетерогенности шизофрении как заболевания. Одновременное сосуществование патогенетических механизмов, соответствующих разным гипотезам патогенеза шизофрении, предполагает широкий спектр маркеров для исследования. Принимая во внимание гетерогенный характер шизофрении, как в отношении этиологии, так и в отношении профиля симптомов, можно заранее предположить, что будет невозможно обнаружить узкий круг специфических маркеров, способных правильно дифференцировать шизофрению. Соответственно нами был выбран путь, направленный на создание профиля биомаркеров, соответствующего комплексному характеру самого заболевания.

Представляет особый интерес сравнение и сопоставление выявленных наиболее значимых маркеров в сыворотке крови, определяемых с помощью скрининговых методов, с изменениями в белковом спектре, выявленными с помощью протеомного анализа. Соответственно второй методологический подход в работе был направлен на проведение сравнительного протеомного анализа сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц для выявления у пациентов специфических белков, не характерных для здоровых лиц.

На основании литературных данных и результатов наших работ предложен следующий перечень определяемых в сыворотке крови показателей: концентрация окисленного и восстановленного глутатиона, содержание дофамина и глутамата, спектр молекул средней массы (нуклеарная, ароматическая и токсическая фракции), уровень АТ к нативной и денатурированной ДНК, концентрация кортизола, мозгового нейротрофического фактора (BDNF), уровень антител к белку S-100, концентрация ДГЭА и ДГЭАС [1]. Исследование периферических биомаркеров в сыворотке крови пациентов проводилось с учетом клинической симптоматики и длительности заболевания.

**Целью** настоящего исследования явился поиск периферических маркеров шизофрении с использованием скрининговых методов и протеомного ана-

лиза.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Клинически обследовано 230 лиц, из них 180 пациентов имели диагноз шизофрения, 50 психически и соматически здоровых человек составили группу контроля. Все пациенты находились на лечении в отделении эндогенных расстройств НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (руководитель отделения – д.м.н., профессор А.В. Семке). Критериями включения в исследование для больных являлось наличие установленного диагноза шизофрения, а для здоровых – отсутствие любых форм психических расстройств; для всех лиц – возраст от 18 до 60 лет, отсутствие соматических заболеваний в стадии обострения, отсутствие наркомании и алкоголизма и наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании. При клиническом исследовании пациентов использовалась шкала позитивных и негативных синдромов (PANSS).

Кровь для исследования забирала из локтевой вены утром натощак при поступлении в клинику до назначения терапии в пробирки типа Vacuette с активатором образования сгустка. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 2000 g 20 минут в центрифуге с охлаждением Orto Alresa Digicen 21R (Испания).

Для проведения сравнительного анализа протеомных профилей образцов сыворотки крови больных шизофренией были выполнены следующие этапы: аффинная хроматография для очистки сыворотки крови от мажорных белков, концентрирование белков, электрофорез в ПААГ по методу Леммли. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Autoflex («Bruker Daltonics», Германия) в Объединенном центре геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН (Новосибирск). Для каждого образца записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (1400–2000 импульсов лазера). Для записи использовали программное обеспечение FlexControl 2.4 (Build 38), а для обработки и анализа масс-спектров FlexAnalysis 2.4 (Build 11) фирмы «Bruker Daltonics» (Германия). Идентификацию белков по наборам значений масс-пептидов проводили с использованием опции Peptide Fingerprint программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) («Matrix Science», США). Были заданы следующие параметры поиска: база данных белковых последовательностей NCBI, таксон Homo sapiens.

Для изучения каталитических свойств антител применялся следующий комплекс методов. Выделение IgG из сыворотки крови проводили методом аффинной хроматографии на хроматографе АКТА Pure (GE Healthcare, Швеция). Гомогенность препаратов антител подтверждали методом электрофореза в градиентном 4–18% ПААГ. Белки окрашивали AgNO<sub>3</sub> либо кумасси R-250. Гель-фильтрация антител в условиях рН-шока проводилась методом высоко

эффективной гель-фильтрации: белок элюировали кислым буфером, полученные фракции нейтрализовали 1 М калий-фосфатным буфером (рН 8,8), электрофоретический анализ продуктов реакции проводили при разделении белков по методу Леммли. Для проведения реакции гидролиза ДНК препаратами IgG осуществляли синтез плазмиды pBluescript согласно протоколам фирмы QIAGEN (США) «Plasmid Mini, Midi and Maxi Kits». Определение ДНК-гидролизующей активности антител проводили в 1,2% агарозном геле с последующей окраской ДНК бромистым этидием. Глубина гидролиза оценивалась по превращению суперскрученной формы ДНК плазмиды в кольцевую и линейную формы. Измерение относительной активности IgG было нормализовано по стандартным условиям реакции, а полное преобразование суперскрученной ДНК в линейную форму принималось за 100%. Определение кинетических параметров реакции гидролиза проводили на участках линейной зависимости скорости реакции от времени и концентрации антител методом нелинейной регрессии с использованием программы Origin Pro 8.6.

Определение окисленного и восстановленного глутатиона в сыворотке крови основано на образовании флуоресцирующего комплекса глутатиона с ортофталевым альдегидом. Измерение флуоресценции изучаемых образцов проводилось на спектрофлуориметре Varion (США).

Спектр молекул средней массы оценивали с помощью известного скрининг-метода Н.И. Габриэлян и В.И. Липатовой в нашей модификации. Три фракции МСМ определялись при следующих длинах волн: 230 нм – нуклеарная фракция, 254 нм – токсическая фракция, 280 нм – ароматическая фракция. Результаты представлены в условных единицах с вычислением нескольких коэффициентов: коэффициент ароматичности (КА=E230/E280), коэффициент распределения (КР=E280/E254) и пептидарно-нуклеарный коэффициент (ПНК=E230/E254).

Определение антител к нативной и денатурированной ДНК проводили с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ИФА) «ORGENETEC Diagnostica» (Германия). Определение концентрации дофамина проведено методом ИФА с применением наборов «Dopamine ELISA FastTrack» (Labor Diagnostika Nord, Германия). Определение концентрации кортизола проводили методом ИФА с помощью набора «Стероид ИФА-кортизол-01» («Алкор Био», Россия). Концентрации белка S100B определяли с помощью набора «CanAg S100 EIA» (Fujirebio Diagnostics, INC., США). Определение концентрации дегидроэпиандростерона проводили с использованием набора для ИФА «DHEA EIA3415» (DRG International Inc., Германия). Для определения концентрации дегидроэпиандростерона сульфата использовали набор «Стероид ИФА-ДГЭА-сульфат» («Алкор Био», Россия). Результаты ИФА оценивали по оптической плотности на автоматическом микропланшетном спектрофотометре Epoch (BioTek

Instruments, США) при длине волны 450 нм, для белка S100B при 620 нм, результаты выражены в нг/мл.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы STATISTICA (версия 10.0) для Windows. Выборки проверялись на нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка. Достоверность различий определялась по t-критерию Стьюдента при нормальном распределении для независимых выборок с вычислением среднего и ошибки среднего. Для независимых выборок при распределении, отличающемся от нормального, достоверность различий определяли по U-критерию Манна-Уитни с вычислением медианы и квартилей. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Средний возраст больных шизофренией, включенных в исследование, составил 31,5 (19,1; 47,4) года; длительность заболевания в среднем составила 9,9 (3,8; 19,7) года. Клинически верифицированные диагнозы согласно МКБ-10 поставлены врачами отделения эндогенных расстройств НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Максимально представленная в работе форма шизофрении – параноидная составила 64% от всех обследованных больных. Остальные клинические формы шизофрении представлены: 16% – простой и 20% – резидуальной формами. В соответствии с ведущей симптоматикой пациенты были разделены на две группы: группу с ведущей позитивной симптоматикой ( $23,7 \pm 3,3$  балла по шкале PANSS) и группу с ведущей негативной симптоматикой ( $25,8 \pm 4,1$  балла по шкале PANSS). В качестве контрольной группы обследованы психически и соматически здоровые лица, соответствующие по полу и возрасту больным. Отбор здоровых лиц проводили, используя углубленный опрос с помощью «Анкеты обследования здоровых лиц».

В основе патогенеза шизофрении лежит нарушение соотношения дофамино/глутаматного гомеостаза [2]. Поэтому мы проверили уровни дофамина и глутамата в сыворотке крови участников исследования. Различий в содержании дофамина между пациентами и здоровыми лицами не выявлено, также отсутствовала статистически значимая зависимость его количества от клинических параметров шизофрении. Этот результат может быть связан с целым рядом причин, но в любом случае это говорит о нецелесообразности определения сывороточного дофамина у больных шизофренией. В отличие от дофамина, уровень глутамата в сыворотке крови больных на фоне выраженной клинической симптоматики оказался повышенным: выявлено его увеличение в 2 раза ( $21,303 \pm 0,416$  нмоль/мкл) по сравнению с группой контроля ( $10,566 \pm 0,507$  нмоль/мкл) ( $p < 0,0001$ ) [3]. Этот факт может свидетельствовать о преобладающей роли нарушения глутаматергической нейротрансмиссии при шизофрении.

Наибольшей популярностью среди периферических сывороточных маркеров при психических расстройствах пользуется мозговой нейротрофический

фактор – регуляторный белок нервной ткани, синтезирующийся в нейронах и глиии [4, 5].

Однако по результатам нашей работы статистически значимых различий в концентрации сывороточного BDNF у здоровых людей и больных шизофренией не выявлено. Также не обнаружено значимых различий в его уровне в зависимости от длительности заболевания. Но при изучении концентрации BDNF в сыворотке крови больных шизофренией с учетом преобладающей симптоматики обращает на себя внимание тенденция к увеличению концентрации BDNF в группе пациентов с преобладанием позитивной симптоматики по сравнению с группой с преобладанием негативной симптоматики. Корреляционный анализ выявил положительную корреляцию концентрации BDNF с баллом по шкале PANSS для позитивных симптомов ( $r = 0,284$ ,  $p = 0,004$ ) [6]. Известно, что за формирование позитивной симптоматики отвечает дофаминергическая система, а между BDNF и дофаминергической системой существует тесная связь. BDNF обладает защитным эффектом в отношении дофаминергических нейронов. Дофамин, в свою очередь, способен индуцировать транскрипцию его гена [7]. Вероятно, что при выраженных позитивных симптомах увеличивается синтез BDNF. Исходя из вышесказанного, общую закономерность подтверждает результат параллельного отсутствия изменений в концентрации дофамина и концентрации BDNF в сыворотке крови у обследованных больных. Несмотря на то что экспрессия и секреция BDNF регулируются при развитии нейрональной активности, видимо, процессы, происходящие в головном мозге, в данном случае не находят своё отражение в сыворотке крови.

Другое популярное для исследования при психических расстройствах вещество относится к группе нейростероидов – дегидроэпиандростерон и его сульфат. ДГЭА образуется в мозге и коре надпочечников из нейростероида – предшественника прегненолона, для синтеза последнего необходим холестерин. Описанные нейростероиды состоят в тесной функциональной взаимосвязи с BDNF. Они регулируют его уровень, а BDNF, в свою очередь, может модулировать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [8]. Другим автором описывается антиглюкокортикоидное действие ДГЭАС, защищающее клетки гиппокампа от нейротоксических эффектов кортизола [9]. Наше исследование сывороточного ДГЭАС у больных шизофренией показало его достоверное снижение по сравнению со здоровыми лицами ( $p = 0,001$ ). Кроме того, были выявлены половые особенности содержания ДГЭАС в сыворотке крови больных и здоровых лиц. У больных мужчин обнаружена более высокая концентрация ДГЭАС по сравнению с женщинами. Существенное уменьшение ДГЭАС у мужчин, больных шизофренией, по сравнению со здоровыми мужчинами обнаружено в зависимости от увеличения длительности заболевания. Статистически значимое уменьшение сывороточного ДГЭАС выявлено

но в группе пациенток с продолжительностью заболевания более 3 лет.

Таким образом, длительность шизофренического процесса коррелирует со снижением концентрации ДГЭАС в сыворотке пациентов [6, 10].

Кроме того, известно, что коэффициенты ДГЭА и ДГЭАС к кортизолу в сыворотке крови отрицательно коррелируют с продолжительностью заболевания. В результате ИФА у пациентов с шизофренией было выявлено достоверное ( $p=0,048$ ) повышение уровня кортизола в сыворотке крови ( $610,27 \pm 15,58$  нмоль/л) по сравнению с группой контроля ( $540,73 \pm 22,94$  нмоль/л). В то же время не было выявлено статистической разницы в группах с разной клинической симптоматикой и длительностью заболевания [11]. Снижение концентрации ДГЭАС, одновременно с увеличением концентрации кортизола у этих же больных, может быть обусловлено наличием общего предшественника прегненолона в системе синтеза гормонов кортизола и ДГЭА [6].

Одним из неспецифических компонентов патогенеза шизофрении является синдром эндогенной интоксикации, в основе которого лежит активация деструктивных процессов у больных шизофренией. До настоящего времени не до конца понятен механизм запуска этих процессов. Неспецифические воспалительные реакции при шизофрении наряду с повышенной секрецией глюкокортикоидов (кортизола в частности) активируют кинурениновый путь распада триптофана в центральной нервной системе, что может иметь ряд нейротоксических эффектов [12].

Уровень эндогенной интоксикации принято оценивать по спектру молекул средней массы (МСМ), представленному тремя фракциями молекул, отличающихся по молекулярной массе. Патологические изменения в содержании МСМ связывают с нарушением процессов протеолиза у больных шизофренией. В ходе исследования МСМ, как показателя эндогенной интоксикации, у больных на фоне выраженной клинической симптоматики было обнаружено достоверное увеличение токсической фракции и снижение коэффициента распределения ( $МСМ_{254}=0,321 \pm 0,048$  усл.ед.  $A_{254}$ ,  $p=0,005$ ;  $KP=0,909 \pm 0,013$ ,  $p<0,001$ ) по сравнению с группой контроля ( $МСМ_{254}=0,287 \pm 0,015$  усл.ед.  $A_{254}$ ,  $KP=1,235 \pm 0,103$ ). Кроме того, выявлено достоверное повышение коэффициента ароматичности при достоверном снижении самой ароматической фракции ( $КА=0,472 \pm 0,133$ ,  $p<0,001$ ;  $МСМ_{280}=0,293 \pm 0,058$  усл.ед.  $A_{280}$ ,  $p=0,005$ ) по сравнению с группой контроля ( $КА=0,365 \pm 0,146$ ;  $МСМ_{280}=0,323 \pm 0,076$  усл.ед.  $A_{280}$ ). Также показано достоверное повышение содержания нуклеарной фракции ( $МСМ_{230}=0,116 \pm 0,021$  усл.ед.  $A_{230}$ ,  $p<0,001$ ) по сравнению с группой контроля ( $МСМ_{230}=0,098 \pm 0,035$  усл.ед.  $A_{230}$ ). Увеличение нуклеарной фракции МСМ<sub>230</sub> связано с накоплением в крови остатков нуклеиновых кислот, появившихся, возможно, в результате усиления процессов

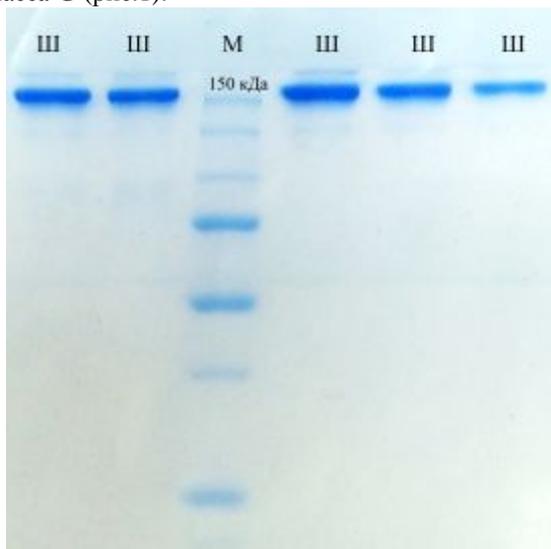
апоптоза при шизофрении [13].

Этот результат, подтверждающий наличие в сыворотке крови больных шизофренией остатков нуклеиновых кислот, напрямую связан с результатами большого исследования, выявившего в сывороточных показателях больных шизофренией наличие ДНК-гидролизующей активности, что имеет важное фундаментальное значение в исследовании патогенеза этого заболевания.

Наличие поврежденной ДНК предполагало проверку уровня АТ к ДНК у больных шизофренией. Но увеличение титра АТ к ДНК выявлено не было. Определение уровня антител к двунизовой ДНК у больных шизофренией показало, что он остается в пределах нормальных значений и практически не имеет достоверных различий со здоровыми лицами и в зависимости от клинических особенностей заболевания. При изучении количества АТ к денатурированной (однонизовой) ДНК обнаружено достоверное снижение титра у больных шизофренией ( $p=0,009$ ) в отличие от здоровых лиц. У больных с ведущей негативной симптоматикой выявлено достоверное ( $p=0,005$ ) снижение титра АТ к однонизовой ДНК ( $5,44 \pm 2,33$  Е/мл) по сравнению с контрольной группой ( $7,88 \pm 2,75$  Е/мл). При увеличении длительности заболевания от 2 до 7 лет снижение титра АТ становится значимым ( $6,61 \pm 3,85$ ;  $p=0,049$ ) и при длительности более 7 лет продолжает снижаться ( $4,85 \pm 2,25$ ;  $p=0,005$ ). Можно предположить, что снижение уровня АТ к ДНК у больных с ведущей негативной симптоматикой и в зависимости от длительности заболевания является отражением снижения или изменения функциональных свойств IgG [14]. Таким образом, несмотря на наличие остатков нуклеиновых кислот в крови больных шизофренией, аутоантител к ним в организме больных не образуется. Значит, должен существовать другой механизм их утилизации.

На основании данных о высокой ДНК-гидролизующей активности IgG при ряде заболеваний [15, 16, 17] нами изучена аналогичная активность IgG, выделенных из сыворотки крови больных шизофренией. Принадлежность изучаемой каталитической активности непосредственно АТ подтверждена соответствием ряду жестких критериев, а именно выделение антител на аффинном сорбенте, электрофоретическая гомогенность антител, соответствие профиля оптической плотности при гель-фильтрации антител в кислых условиях (рН 2,6) и профиля каталитической активности. На основании связывания выделенных IgG со специфическим сорбентом Protein G Sepharose был доказан факт принадлежности исследуемой нами активности непосредственно иммуноглобулинам класса G больных шизофренией. Гомогенность препаратов IgG была подтверждена методом градиентного электрофореза, в ходе которого было показано наличие единственной полосы на уровне молекулярной массы 150 кДа, что соответствует иммуноглобулинам

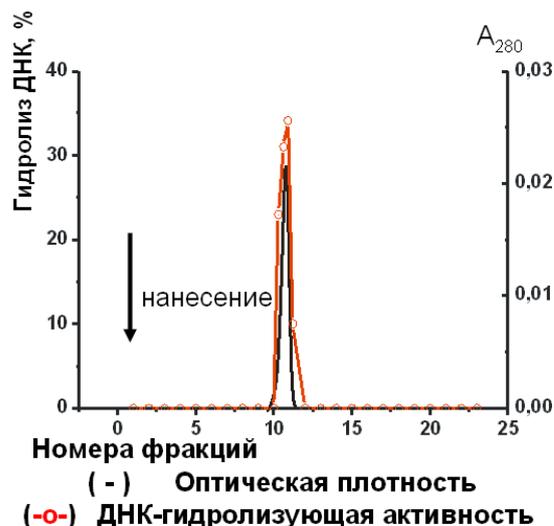
класса G (рис.1).



**Рисунок 1. Электрофоретический анализ гомогенности препаратов IgG (окраска Cumassi R-250)**

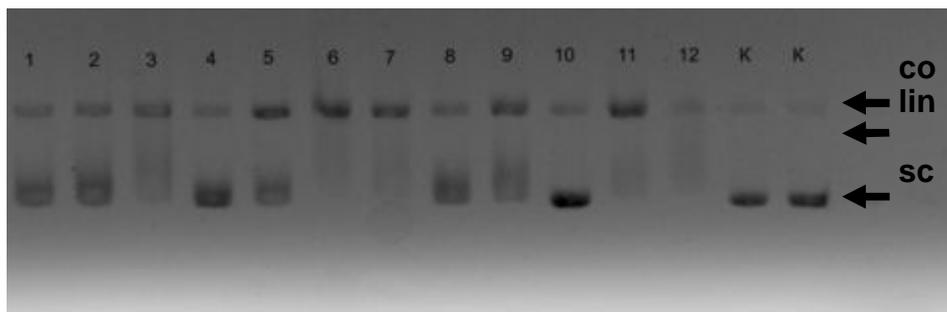
**Примечание.** Препаратам IgG на электрофореграмме соответствует полоса 150 кДа. М – маркеры молекулярной массы белков, Ш – IgG крови больных шизофренией.

Кроме того, была проведена высокоэффективная гель-фильтрация препаратов IgG в условиях рН-шока (рН 2,6). ДНК-гидролизующую активность препаратов антител оценивали по гидролизу ДНК плазмиды. Гельфильтрация IgG в условиях рН-шока не привела к снижению ДНК-гидролизующей активности. Для исследованных препаратов антител профиль оптической плотности ( $\lambda=280$  нм) совпадал с профилями ДНК-гидролизующей активности (рис. 2), что является ещё одним доказательством принадлежности изучаемой активности непосредственно IgG [18].



**Рисунок 2. Профили высокоэффективной гель-фильтрации (рН 2,6) смеси выделенных IgG сыворотки больных шизофренией**

По результатам нашего исследования, 93% всех обследованных больных шизофренией продемонстрировали высокую ДНК-азную активность IgG, имеющую достоверные отличия с контрольной группой (рис. 3). Кроме того, ДНК-гидролизующая активность IgG продемонстрировала наличие зависимости от ведущей симптоматики [19]. Среднее значение относительной ДНК-азной активности иммуноглобулинов класса G пациентов с ведущей позитивной симптоматикой (56,1%) практически в 1,6 раза выше ( $p<0,05$ ), чем для пациентов с ведущей негативной симптоматикой (34,0%).



**Рисунок 3. Анализ ДНК-азной активности препаратов IgG**

**Примечание.** Дорожки 1–12 – препараты IgG больных шизофренией; формы ДНК – плазмиды pBluescript: sc – суперскрученная, co – кольцевая, lin – линейная; К – контроль.

Относительная активность гидролиза ДНК антителами здоровых лиц колеблется в пределах от 0 до 10%.

Кроме того, были определены кинетические параметры реакции гидролиза: константы Михаэлиса и каталитической константы:  $K_m$  и  $V_{max}$  ( $k_{cat}$ ) гидролиза суперскрученной ДНК. Для препарата IgG

больного шизофренией с ведущей негативной симптоматикой константы  $K_m$  и  $k_{cat}$  были следующими:  $K_m=95\pm 18$  нМ,  $k_{cat}=(2,7\pm 0,3)\times 10^{-3}$   $\text{min}^{-1}$ . Препарат IgG больного шизофренией с ведущей позитивной симптоматикой обладал схожим значением  $K_m=85,0\pm 12,0$  нМ и в то же время более высоким значением  $k_{cat}=(7,9\pm 0,5)\times 10^{-3}$   $\text{min}^{-1}$ . Таким образом,

активность абзимов проявляет большее сродство к ДНК, чем у классических ДНК-аз [20].

Кроме того, на небольшой выборке больных была выявлена высокая протеолитическая и оксидоредуктазная активность сывороточных IgG больных шизофренией [21, 22, 23, 24]. На основании этих фактов мы предположили, что каталитически активные антитела больных шизофренией берут на себя ферментативные функции, сниженные в процессе развития заболевания. Наличие окислительного стресса и дисфункции антиоксидантной системы у больных шизофренией подтверждено большим количеством работ [25, 26, 27, 28]. Для оценки состояния антиоксидантной системы у наших больных был выбран наиболее информативный маркер состояния окислительно-восстановительных процессов – глутатион. Мы не выявили взаимосвязи изменений количества восстановленного глутатиона как с длительностью заболевания, так и с преобладающей симптоматикой больных шизофренией. В то же время содержание окисленной формы глутатиона достоверно снижено у больных с ведущей позитивной симптоматикой и зависит от длительности заболевания. В группе больных шизофренией с длительностью заболевания менее 2 лет уже выявлено достоверное снижение окисленного глутатиона в сравнении со здоровыми людьми, в дальнейшем эта тенденция сохраняется. Увеличение количества окисленного глутатиона и тенденция к снижению восстановленного антиоксиданта говорит о явном сдвиге в сторону прооксидантных процессов при длительном течении заболевания [29].

Таким образом, результаты нашего исследования убедительно доказывают активацию окислительного стресса и выраженное повреждение клеточных структур у больных шизофренией, что, в свою очередь, может запускать воспалительные реакции, роль которых также широко обсуждается в патогенезе шизофрении [30]. Эти процессы должны сопровождаться появлением соответствующих маркеров – мозгоспецифических белков или антител к ним.

Мы провели исследование белка S100B – маркера повреждения глиальных клеток – в сыворотке крови обследованных лиц. Концентрация S100B в группе больных шизофренией оказалась статистически значимо повышена по сравнению с группой контроля ( $p < 0,001$ ). Но она не зависела от длительности заболевания и ведущей клинической симптоматики, оцененной по шкале PANSS [31]. Другой важный компонент, отражающий целостность клеток глии, – это основной белок миелина (ОБМ) олигодендроцитов. Его выраженные иммуногенные свойства могут способствовать появлению аутоантител на периферии. Определение уровня сывороточных антител к ОБМ у больных шизофренией выявило достоверный рост ( $p = 0,0004$ ) содержания IgG к ОБМ по сравнению с группой контроля. Однако в группах пациентов с разной ведущей симптоматикой не было обнаружено достоверной разни-

цы в содержании сывороточных антител к ОБМ [32].

В совокупности эти изменения не являются строго специфичными для патогенеза шизофрении, однако могут свидетельствовать о нарушении нейроглиальных взаимодействий и являться важными маркерами для мониторинга состояния пациентов в ходе лечения.

Таким образом, наше исследование классических периферических маркеров шизофрении выявило крайне гетерогенный характер их изменений и, по сути, отсутствие возможности с их помощью достаточно полно и информативно охарактеризовать происходящие в организме больных изменения. Поэтому актуален поиск возможных новых маркеров шизофрении с помощью высокотехнологичных протеомных методов.

Анализ протеомных профилей образцов сыворотки крови выявил различия в электрофоретическом распределении белков, специфичные для шизофрении и не характерные для здоровых лиц. Достоверные отличия в спектре распределения белков были обнаружены нами в областях высоких, средних и низких молекулярных масс: 206, 180, 128, 97, 94, 88, 40, 32, 30, 28, 20, 15 и 12 кДа [33]. Этот наш результат согласуется с результатом, полученным японскими коллегами Н. Tanaka, Y. Yoshimura et al., которые также выявили отличия в области 180 и 120–128 кДа у больных по сравнению со здоровыми людьми [34].

При проведении сравнительного масс-спектрометрического анализа белков из выявленных областей были обнаружены белки, встречающиеся у больных шизофренией и отсутствующие у здоровых лиц (таблица 1).

Таблица 1

Белки сыворотки крови, выявленные у больных шизофренией, которые отсутствуют в сыворотке здоровых лиц			
Молекулярная масса, Да	Score	Название белка	Код белка
92843	75	V-тип иммуноглобулиноподобного домена	Q86VR7
30651	73	H-связывающий фактор комплемента второго типа	P36980
28116	62	Ядерный белок-1 специфичный для зародышевых гаплоидных клеток	Q75WM6
21995	58	Фосфомевалонаткиназа (EC 2.7.4.2)	Q15126

В области 90–95 кДа найден белок с молекулярной массой 92843 Да – V-тип иммуноглобулиноподобного домена [35]. Это трансмембранный белок, содержащий сигнальный пептид, иммуноглобулин-подобный домен V типа, который действует как ингибитор альтернативного пути активации комплемента. Показано, что активация C3-комплемента вызывает структурные перестройки этого белка в области тиоэфирной связи, через которую V тип Ig-подобного домена прикрепляет поверхностный патоген [36]. Это белок не только входит в состав фагоцитарного рецептора, но также является мощ-

ным ингибитором альтернативных конвертазных путей.

Таким образом, структура данного белка дает представление о сложных макромолекулярных структурных перестройках, которые происходят во время активации комплемента. Иммуногистохимический анализ продемонстрировал экспрессию данного белка в печени, на клетках Купфера и на макрофагах в различных тканях, включая сердце, надпочечники и легкие [37].

В области 30 кДа обнаружен белок с молекулярным весом 30631 Да – связывающий фактор комплемента второго типа (Complement factor H-related protein 2-CFHR2) [38]. Этот белок также участвует в регуляции системы комплемента. Фрагменты комплемента эффективно конкурируют с физиологическим ингибитором комплемента CFH. H-связывающий фактор комплемента второго типа может ассоциироваться с липопротеинами и может играть определенную роль в липидном метаболизме. Концентрация CFHR2 в сыворотке крови является относительно низкой (<50 мкг/мл). Его функциональное значение ещё не изучено, известна только его способность связываться с некоторыми бактериями, которые в дальнейшем подвергаются комплемент-зависимому лизису. Однако роль CFHR2-белка в регуляции комплемента до сих пор не ясна [39].

В общей картине эти данные о белках, модулирующих иммунный ответ, укладываются в известное изменение иммунологического гомеостаза при шизофрении, обусловленное снижением регулирующей функции системы Т-лимфоцитов супрессоров, которое приводит к активации гуморального иммунитета у этих больных [40].

В белковой области 28 кДа идентифицирован ядерный белок-1, специфичный для зародышевых гаплоидных клеток с молекулярным весом 28116 Да [41]. Альтернативные названия этого белка: гистон H1t2 или Haspin – сокращённое название от «haploid germ cell-specific nuclear protein kinase» – это ядерная протеинкиназа, специфичная для гаплоидных зародышевых клеток. Он необходим для конденсации ДНК, связывает двух- и одноцепочечную ДНК, АТФ и протамин-1. Впервые обнаружена экспрессия белка Haspin избирательно в семенниках, позднее в более низких концентрациях он был обнаружен в тимусе, костном мозге, печени и других тканях, а также во всех пролиферирующих клетках. Белок Haspin 1 представляет собой серин-треониновую протеинкиназу, активирующую митоз в делящихся клетках [42].

В низкомолекулярной белковой области в районе 20 кДа была обнаружена экспрессия фосфомевалонат киназы (EC 2.7.4.2) с молекулярным весом 21995 Да. Фосфомевалонат киназа – фермент мевалонатного пути, включающего реакции, начинающиеся с кофермента ацетила (ацетил-СоА) и приводящие к образованию фарнезилпирофосфата, который лежит в основе продукции холестерина, желчных кислот, долина и пренелирования белков.

Учитывая важную роль изопреноидов, диспропорции в их синтезе могут привести к клеточной дисфункции и развитию заболеваний с нарушениями липидного спектра. Мы предполагаем, что экспрессия этого энзима у больных шизофренией может быть компенсаторным механизмом в ответ на изменение метаболизма стероидов и нейростероидов, описанное нами выше, в котором холестерин играет роль метаболического предшественника, необходимого для их синтеза [43].

Таким образом, с помощью метода протеомного анализа у больных шизофренией выявлены 4 неспецифических белка, определённым образом характеризующие нарушения адаптивных и гомеостатических возможностей этих пациентов.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В результате комплексного исследования в крови больных шизофренией было выявлено достоверное повышение концентрации глутамата, кортизола, глиального белка S100B, антител к ОБМ, нуклеарной фракции МСМ, ДНК гидролизующей активности IgG на фоне выраженного снижения уровня нейростероидов ДГЭА и ДГЭАС, ароматической фракции МСМ, АТ к одонитовой ДНК, окисленного глутатиона. Все эти разнонаправленные изменения вполне определённым образом характеризуют патогенетические изменения в организме больных.

В то же время изменения ряда других показателей обозначили выраженную зависимость от клинических особенностей шизофрении. Мозговой нейротрофический фактор и активность ДНК-гидролизующих антител показали положительную корреляцию с ведущими позитивными симптомами, что определённым образом характеризует защитные силы организма, стремящиеся, по всей видимости, нивелировать последствия острого психоза. Напротив, зависимость от ведущей негативной симптоматики и от длительности заболевания вызывает однонаправленные изменения, отражающие снижение функциональных сил организма, и выражается в снижении у этих больных концентрации стероидного нейропротектора ДГЭАС, окисленного глутатиона и АТ к одонитовой ДНК. Возможно, что использование показателей, имеющих зависимость от клинической симптоматики и длительности заболевания, в качестве дополнительных параклинических методов позволит прогнозировать картину развития заболевания и в перспективе поможет оценить эффективность проводимой терапии.

Выявленные с помощью масс-спектрометрии в сыворотке крови больных шизофренией белки, которые отсутствуют в сыворотке здоровых людей, вероятно, являются следствием развившегося заболевания и позволяют прояснить неизвестные ранее особенности патогенеза болезни. Возможно, именно методы протеомного анализа позволят выявить специфические маркёры шизофрении.

### **КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в связи с публикацией данной статьи.

### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-00480 «Поиск ключевых биомаркеров патогенеза социально значимых эндогенных психических расстройств» (2014–2016).

### СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Протокол комплексного обследования больных рассмотрен и утвержден биоэтическим комитетом НИИ психического здоровья Томского НИМЦ в соответствии с Хельсинкским соглашением по правам человека (№ 45 от 21 ноября 2011 г.).

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность за проведение протеомного анализа Владимиру Васильевичу Ковалю, руководителю Объединенного Центра геномных, протеомных и метаболомных исследований ИХБФМ СО РАН (Новосибирск).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Узбеков М.Г., Гурович И.Я., Иванова С.А. Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода. *Социальная и клиническая психиатрия*. 2016; 1 (26): 77–94.
2. Marc Laruelle, Lawrence S. Kegeles, Anissa Abi-Dargham. Glutamate, Dopamine, and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1003: 138–158. doi 10.1196/annals.1300.063
3. Ivanova S.A., Boyko A.S., Fedorenko O.Yu., Krotchenko N.M., Semke A.V., Bokhan N.A. Glutamate concentration in the serum of patients with schizophrenia. *Procedia Chemistry*. 2014; 10: 80–85.
4. Dell'Osso L., Del Debbio A., Veltri A., Bianchi C., Roncaglia I., Carlini M., Massimetti G., Catena Dell'Osso M., Vizzaccaro C., Marazziti D., Piccini A. Associations between Brain-Derived Neurotrophic Factor Plasma Levels and Severity of the Illness, Recurrence and Symptoms in Depressed Patients. *Neuropsychobiology*. 2010; 62: 207–212. doi 10.1159/000319946
5. Nieto R., Kukuljan M., Silva H. BDNF and schizophrenia: from neurodevelopment to neuronal plasticity, learning, and memory. *Front. Psychiatry*. 2013; 4(45). doi org/10.3389/fpsy.2013.00045
6. Федоренко О.Ю., Лосенков И.С. Нейропротективные процессы у больных шизофренией. В книге: Биологические маркеры шизофрении: поиск и клиническое применение. Бойко А.С., Бохан Н.А., Бунева В.Н., Ветлугина Т.П., Зозуля С.А., Иванова С.А., Клошник Т.П., Корнетова Е.Г., Лосенков И.С., Олейчик И.В., Семке А.В., Смирнова Л.П., Узбеков М.Г., Федоренко О.Ю. Новосибирск, 2017: 105–130. <https://elibrary.ru/item.asp?id=29013279>
7. Favalli G., Li J., Belmonte-de-Abreu P., Wong A.H., Daskalakis Z.J. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J. Psychiatr Res*. 2012; 46 (1): 1–11. doi 10.1016/j.jpsychires
8. Naert G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L. Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32 (8-10): 1062–78.
9. Misiak B., Frydecka D., Loska O., Moustafa A.A., Samochowiec J., Kasznia J., Stańczykiewicz B. Testosterone, DHEA and DHEA-S in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2018; 89: 92–102.
10. Loonen A.J.M., Ivanova S.A. Schizophrenia treatment – the new facets. Rijeka (Croatia): InTech; 2016. Chapter 6, Circuits Regulating Pleasure and Happiness in Schizophrenia: The Neurobiological Mechanism of Delusions: 109–134.
11. Бойко А.С., Иванова С.А. Периферические маркеры деструктивных процессов у больных шизофренией. В книге: Биологические маркеры шизофрении: поиск и клиническое применение. Бойко А.С., Бохан Н.А., Бунева В.Н., Ветлугина Т.П., Зозуля С.А., Иванова С.А., Клошник Т.П., Корнетова Е.Г., Лосенков И.С., Олейчик И.В., Семке А.В., Смирнова Л.П., Узбеков М.Г., Федоренко О.Ю. Новосибирск, 2017: 105–130. <https://elibrary.ru/item.asp?id=28973472>
12. Шилов Ю.Е., Безруков М.В. Кинуренины в патогенезе эндогенных психических заболеваний. Актуальные вопросы неврологии и психиатрии. *Вестник РАМН*. 2013; 1: 35–41.
13. Бойко А.С., Иванова С.А., Семке А.В., Бохан Н.А. Биомаркеры деструктивных процессов в сыворотке крови больных шизофренией. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 12–1: 56–61.
14. Смирнова Л.П., Ермаков Е.А., Бойко А.С., Бохан Н.А., Семке А.В., Иванова С.А. Антитела к нативной и денатурированной ДНК в сыворотке крови больных шизофренией в зависимости от клинических характеристик заболевания. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016; 4(116): 47–51.
15. Nevinsky G. A., Buneva V. N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2003; 7 (3): 265–276. DOI 10.1111/j.1582-4934.2003.tb00227.x
16. Бунева В.Н., Красноручский М.А., Невинский Г.А. Природные антитела к нуклеиновым кислотам. *Биохимия*. 2013; 78(2): 185–203. doi 10.1134/S0006297913020028
17. Бунева В.Н., Невинский Г.А. Исключительное многообразие каталитических антител с различными каталитическими активностями в крови пациентов с аутоиммунными и вирусными заболеваниями. *Молекулярная биология*. 2017; 51 (6): 969–984.
18. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Borodyuk Y.N., Buneva V.N., Ivanova S.A., Nevinsky G.A. Possibility of pathogenic regulation of oxidative stress by catalytic antibody of patient with schizophrenia. *Acta Nature*. 2014; Spec No 1: 54.
19. Ермаков Е.А., Синянский Л.Е., Добрыгина Д.С. ДНК-гидролизующая активность антител сыворотки крови больных шизофренией с позитивной и негативной симптоматикой. Материалы 53-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2015. М.: Медицина, 2015: 14.
20. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Parkhomenko T.A., Dmitrenok P.S., Krotchenko N.M., Fattakhov N.S., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia. *Open Biol*. 2015; 5 (9): 150064.
21. Паршукова Д.А., Смирнова Л.П., Дмитриева Е.Г., Одинцова Е.С., Иванова С.А., Невинский Г.А., Бунева В.Н. Природные абзимы крови больных шизофренией с протеолитической активностью. Научные труды V Съезда физиологов СНГ, V Съезда биохимиков России. *Acta Naturae*. 2016; Suppl: 43–44.
22. Parshukova D., Borodyuk Y., Smirnova L., Buneva V., Ivanova S., Semke A. The G-immunoglobulins of schizophrenic patients demonstrate proteolytic activity. *European Neuropsychopharmacology*. 2016; 26; Suppl 1: 20–21.
23. Синянский Л.Е., Меднова И.А., Ермаков Е.А. Абзимы с оксидоредуктазной активностью. Материалы 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016. М.: Медицина, 2016: 25.
24. Sinyanski L., Smirnova L., Krotchenko N., Mednova I., Ermakov E., Titova M., Alifirova V., Semke A., Ivanova S. Immunoglobulins G with oxidoreductase activity of patients with schizophrenia and multiple sclerosis. DRAFT ABSTRACT BOOK of 13th ISNI Congress Jerusalem. 2016: 129–130.
25. Щигорева Ю.Г., Смирнова Л.П., Кротченко Н.М., Бойко А.С., Корнетова Е.Г., Семке А.В. Активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах периферической крови у больных шизофренией с tardивной дискинезией. *Современные проблемы науки и образования*. 2013; 5: 341.
26. Иванова С.А., Смирнова Л.П., Щигорева Ю.Г., Бойко А.С., Семке А.В., Узбеков М.Г., Бохан Н.А. Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы в эритроцитах больных шизофренией в динамике фармакотерапии традиционными антипсихотическими препаратами. *Нейрохимия*. 2014; 31 (1): 79–83
27. Flatow J., Buckley P., Miller B. J. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biological Psychiatry*. 2013; 74 (6): 400–409. doi 10.1016/j.biopsych.2013.03.018
28. Ng F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence

- base and therapeutic implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. 2008; 11 (6): 851–876. doi: 10.1017/S14611457007008401
29. Иванова С.А., Смирнова Л.П., Щигорева Ю.Г., Семке А.В., Бохан Н.А. Глутатин в сыворотке крови больных шизофренией в динамике антипсихотической терапии. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2015; 8 (160): 255–258.
  30. Bergink V., Gibney S.M., Drexhage H.A. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry*. 2014; 75 (4): 324–331. doi 10.1016/j.biopsych.2013.09.037
  31. Бойко А.С., Лосенков И.С., Дмитриева Е.Г. Применение мультиплексного анализа в определении периферических биомаркеров у больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016; 4 (17): 196–201.
  32. Паршукова Д.А. Исследование уровня антител к основному белку миеллина у пациентов с шизофренией и здоровых лиц. Актуальные вопросы психиатрии и наркологии: сборник тезисов. Томск : Изд-во «Иван Федоров», 2016; 18: 125–126.
  33. Дмитриева Е.М., Смирнова Л.П., Логинова Л.В., Серегин А.А., Дмитриева Е.Г., Иванова С.А. Анализ различий в электрофоретическом распределении белков сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц. *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2014; 3 (49): 209–210.
  34. Tanaka H., Yoshimura Y., Nozaki M., Yomogida K., Tsuchida J., Tosaka Y., Habu T., Nakanishi T., Okada M., Nojima H., Nishimune Y. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem*. 1999; 274 (24): 17049–57.
  35. Летова А.А., Дмитриева Е.М., Серегин А.А. Выявление потенциальных белковых маркеров шизофрении. Материалы 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016. М.: Медицина, 2016: 14.
  36. Wiesmann C., Katschke K.J., Yin J., Helmy K.Y., Steffek M., Fairbrother W.J., McCallum S.A., Embuscado L., DeForge L., Hass P.E., van Lookeren Campagne M. Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. *Nature*. 2006; 444 (7116): 217–20.
  37. Helmy K.Y., Katschke K.J.Jr., Gorgani N.N., Kljavin N.M., Elliott J.M., Diehl L., Scales S.J., Ghilardi N., van Lookeren Campagne M. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell*. 2006; 124 (5): 915–27.
  38. Letova A., Dmitrieva E., Seregin A. Detection of potential protein markers for schizophrenia. Abstract book of the International student congress of (Bio). *Medical Sciences*. 2016: 564.
  39. Hammerschmidt C., Hallström T., Skerka C., Wallich R., Stevenson B., Zipfel P.F., Kraiczky P. Contribution of the infection-associated complement regulator-acquiring surface protein 4 (ErpC) to complement resistance of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 349657.
  40. Лобачева О.А., Ветлугина Т.П., Семке А.В. Нейроиммунные взаимодействия при шизофрении. *Нейроиммунология*. 2007; 2 (5): 74.
  41. Дмитриева Е.М., Логинова Л.В., Коваль В.В., Смирнова Л.П. Идентификация различий в белковом спектре сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц с помощью MALDY-TOF масс-спектрометрии. Актуальные вопросы психиатрии и наркологии: сборник тезисов XVII научной отчетной сессии НИИ психического здоровья и II Российско-китайской научно-практической конференции «Актуальные вопросы биопсихосоциальной реабилитации пациентов с аффективными расстройствами». Томск, 2015; 96–98.
  42. Tanaka H., Iguchi N., Isotani A., Kitamura K., Toyama Y., Matsuoka Y., Onishi M., Masai K., Maekawa M., Toshimori K., Okabe M., Nishimune Y. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol*. 2005; 25 (16): 7107–19.
  43. Смирнова Л.П., Логинова Л.В., Дмитриева Е.М., Серегин А.А., Семке А.В., Симуткин Г.Г., Иванова С.А. Первые результаты сравнения протеомов сыворотки крови больных шизофренией и биполярным аффективным расстройством. *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2016; 2 (91): 42–47.

Поступила в редакцию 1.02.2018  
Утверждена к печати 2.04.2018

Смирнова Людмила Павловна, к.м.н., с.н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии.  
Паршукова Дарья Андреевна, м.н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии.  
Ермаков Евгений Александрович, ассистент кафедры молекулярной биологии и биотехнологии, старший лаборант лаборатории ферментов репарации.  
Дмитриева Елена Михайловна, м.н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии.  
Бойко Анастасия Сергеевна, к.м.н., н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии.  
Федоренко Ольга Юрьевна, д.м.н., в.н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии.  
Логинова Лариса Викторовна, аспирант.  
Кротенко Нина Михайловна, к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной генетики и биохимии, доцент кафедры нормальной физиологии.  
Серегин Александр Александрович, аспирант.  
Летова Анастасия Александровна, студентка.  
Синянский Лев Евгеньевич, ординатор.  
Корнетова Елена Георгиевна, д.м.н., в.н.с. отделения эндогенных расстройств, консультант-психиатр клиник СибГМУ.  
Иванова Светлана Александровна, д.м.н., профессор, заместитель директора по НИР, заведующая лабораторией молекулярной генетики и биохимии.

✉ Смирнова Людмила Павловна, lpsmirnova@yandex.ru

УДК 616.895.8:57.083.3

For citation: Smirnova L.P., Parshukova D.A., Ermakov E.A., Dmitrieva E.M., Boiko A.S., Fedorenko O.Yu., Loginova L.V., Krotenko N.M., Seregin A.A., Letova A.A., Sinyansky L.E., Kornetova E.G., Ivanova S.A. Outcomes of search for biomarkers of schizophrenia. *Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry*. 2018; 2 (99): 33–44. [https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-2\(99\)-33-44](https://doi.org/10.26617/1810-3111-2018-2(99)-33-44)

## Outcomes of search for biomarkers of schizophrenia

**Smirnova L.P.<sup>1</sup>, Parshukova D.A.<sup>1</sup>, Ermakov E.A.<sup>2</sup>, Dmitrieva E.M.<sup>1</sup>,  
Boiko A.S.<sup>1</sup>, Fedorenko O.Yu.<sup>1</sup>, Loginova L.V.<sup>1,3</sup>, Krotenko N.M.<sup>1,3</sup>,  
Seregin A.A.<sup>1</sup>, Letova A.A.<sup>3</sup>, Sinyansky L.E.<sup>3</sup>, Kornetova E.G.<sup>1,3</sup>, Ivanova S.A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences  
Aleutskaya Street 4, 634014, Tomsk, Russian Federation

<sup>2</sup> Institute of Chemical Biology and Basic Medicine  
Academician Lavrentyev Avenue 8, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

<sup>3</sup> Siberian State Medical University  
Moskovsky Trakt 2, 634050, Tomsk, Russian Federation

## ABSTRACT

As a result of complex study of a number of parameters of blood serum of schizophrenic patients a reliable elevation of concentration of glutamate, cortisol, glial protein S100B, antibodies to myelin basic protein, nuclear fraction of middle mass molecules (MMM), DNA-hydrolyzing activity of IgG is revealed against the background of substantial reduction of neurosteroids of dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), aromatic fraction of MMM, antibodies (AB) to single-stranded DNA, oxidized glutathione. Brain neurotrophic factor and activity of DNA-hydrolyzing antibodies show positive correlation with leading positive symptoms in patients with schizophrenia. Factors such as leading negative symptoms and length of disease more than 3 years, on the contrary, cause in these patients unidirectional alterations which are expressed in lowering the concentration of steroid neuroprotector DHEAS, oxidized glutathione and AB to single-stranded DNA. With use of proteomic analysis four non-specific proteins are revealed which characterize pathogenetic alterations in schizophrenia.

**Keywords:** schizophrenia, peripheral biomarkers, neurosteroids, catalytic antibodies.

## REFERENCES

- Uzbekov M.G., Gurovich I.Ya., Ivanova S.A. Potentsialnyie biomarkeryi psichicheskikh zabolevaniy v aspekte sistemnogo podhoda [Potential biomarkers of mental disorders from the standpoint of systems biology]. *Sotsial'naya i klinicheskaya psikhiatriya – Social and Clinical Psychiatry*. 2016; 26 (1): 98–109 (in Russian).
- Marc Laruelle, Lawrence S. Kegeles, Anissa Abi-Dargham. Glutamate, Dopamine, and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1003: 138–158. doi 10.1196/annals.1300.063
- Ivanova S.A., Boyko A.S., Fedorenko O.Yu., Krotenko N.M., Semke A.V., Bokhan N.A. Glutamate concentration in the serum of patients with schizophrenia. *Procedia Chemistry*. 2014; 10: 80–85.
- Dell'Osso L., Del Debbio A., Veltri A., Bianchi C., Roncaglia I., Carlini M., Massimetti G., Catena Dell'Osso M., Vizzaccaro C., Marazziti D., Piccini A. Associations between Brain-Derived Neurotrophic Factor Plasma Levels and Severity of the Illness, Recurrence and Symptoms in Depressed Patients. *Neuropsychobiology*. 2010, 62, 207–212. doi 10.1159/000319946
- Nieto R., Kukuljan M., Silva H. BDNF and schizophrenia: from neurodevelopment to neuronal plasticity, learning, and memory. *Front. Psychiatry*. 2013; 4(45). doi org/10.3389/fpsy.2013.00045
- Fedorenko O.Yu., Losenkov I.S. Neyroprotektivnyie protsessy u bolnykh shizofreniy. V knige: Biologicheskie markeryi shizofrenii: poisk i klinicheskoe primenenie [Neuroprotective processes in schizophrenic patients. In: Biological markers of schizophrenia: search and clinical application]. Boiko A.S., Bokhan N.A., Buneva V.N., Vetlugina T.P., Zozulya S.A., Ivanova S.A., Klyushnik T.P., Kornetova E.G., Losenkov I.S., Oleichik I.V., Semke A.V., Smirnova L.P., Uzbekov M.G., Fedorenko O.Yu. Novosibirsk, 2017: 105 (in Russian).
- Favalli G., Li J., Belmonte-de-Abreu P., Wong A.H., Daskalakis Z.J. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J. Psychiatr Res*. 2012; 46 (1): 1–11. doi 10.1016/j.jpsychires
- Naert G., Maurice T., Tapia-Arancibia L., Givalois L. Neuroactive steroids modulate HPA axis activity and cerebral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32 (8–10): 1062–78.
- Misiak B., Frydecka D., Loska O., Moustafa A.A., Samochowicz J., Kasznia J., Stańczykiewicz B. Testosterone, DHEA and DHEA-S in patients with schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology*. 2018; 89: 92–102.
- Loonen A.J.M., Ivanova S.A. Schizophrenia treatment – the new facets. Rijeka (Croatia): InTech; 2016. Chapter 6, Circuits Regulating Pleasure and Happiness in Schizophrenia: The Neurobiological Mechanism of Delusions: 109–134.
- Boiko A.S., Ivanova S.A. Perifericheskie markeryi destruktivnykh protsessov u bolnykh shizofreniy. V knige: Biologicheskie markeryi shizofrenii: poisk i klinicheskoe primenenie [Peripheral markers of destructive processes in schizophrenic patients. In: Biological markers of schizophrenia: search and clinical application]. Boiko A.S., Bokhan N.A., Buneva V.N., Vetlugina T.P., Zozulya S.A., Ivanova S.A., Klyushnik T.P., Kornetova E.G., Losenkov I.S., Oleichik I.V., Semke A.V., Smirnova L.P., Uzbekov M.G., Fedorenko O.Yu. Novosibirsk, 2017: 105 (in Russian).
- Shilov Yu.E., Bezrukov M.V. Kinureniny v patogeneze endogenykh psichicheskikh zabolevaniy. Aktualnyie voprosy neurologii i psikiatrii (Kynurenines in pathogenesis of endogenous mental diseases. Relevant issues of neurology and psychiatry). *Vestnik RAMN – Bulletin of RAMS*. 2013; 1: 35–41 (in Russian).
- Boiko A.S., Ivanova S.A., Semke A.V., Bokhan N.A. Biomarkeryi destruktivnykh protsessov v syivorotke krovi bolnykh shizofreniy [Biomarkers of destructive processes in serum of schizophrenic patients]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy – International Journal of Applied and Basic Research*. 2015; 12–1: 56–61 (in Russian).
- Smirnova L.P., Ermakov E.A., Boiko A.S., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A. Antitela k nativnoy i denaturirovannoy DNK v syivorotke krovi bolnykh shizofreniy v za-visimosti ot klinicheskikh harakteristik zabolevaniya [Antibodies to native and denatured DNA in the serum of patients with schizophrenia depending on the clinical features of the disease]. *Zhurnal neurologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova – S.S. Korsakov Journal of Neurology and Psychiatry*. 2016; 4(116): 47–51 (in Russian).
- Nevinsky G.A., Buneva V.N. Catalytic antibodies in healthy humans and patients with autoimmune and viral diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2003; 7 (3): 265–276. DOI 10.1111/j.1582-4934.2003.tb00227.x
- Buneva V.N., Krasnorutsky M.A., Nevinsky G.A. Prirodnyie antitela k nukleinovym kislotam [Natural antibodies to nucleic acids]. *Biohimiya - Biochemistry*. 2013. 78(2): 185–203. doi 10.1134/S0006297913020028 (in Russian).
- Buneva V.N., Nevinsky G.A. Isklyuchitelnoe mnogoobrazie kataliticheskikh antitel s razlichnyimi kataliticheskimi aktivnostyami v krovi patsientov s autoimmunnyimi i virusnyimi zabolevaniyami [Exceptional Diversity of Catalytic Antibodies in the Blood of Patients with Autoimmune and Viral Diseases]. *Molekulyarnaya biologiya – Molecular Biology*. 2017; 51 (6): 969–984 (in Russian).
- Ermakov E.A., Smirnova L.P., Borodyuk Y.N., Buneva V.N., Ivanova S.A., Nevinsky G.A. Possibility of pathogenic regulation of oxidative stress by catalytic antibody of patient with schizophrenia. *Acta Nature*. 2014; Spec No 1: 54.
- Ermakov E.A., Sinyansky L.E., Dobrygina D.S. DNK-gidrolizuyushchaya aktivnost antitel syivorotki krovi bolnykh shizofreniy s pozitivnoy i negativnoy simptomatikoy. Materialy 53-y Mezhdunarodnoy nauchnoy studencheskoy konferentsii MNSK-2015 [DNA-hydrolyzing activity of antibodies of serum of schizophrenic patients with positive and negative symptoms. Materials of the 53<sup>rd</sup> International Scientific Students' Conference ISSC-2015]. M.: Meditsina, 2015: 14 (in Russian).

20. Ermakov E.A., Smirnova L.P., Parkhomenko T.A., Dmitrenko P.S., Krotenko N.M., Fattakhov N.S., Bokhan N.A., Semke A.V., Ivanova S.A., Buneva V.N., Nevinsky G.A. DNA-hydrolysing activity of IgG antibodies from the sera of patients with schizophrenia. *Open Biol.* 2015; 5 (9): 150064.
21. Parshukova D.A., Smirnova L.P., Dmitrieva E.G., Odintsova E.S., Ivanova S.A., Nevinsky G.A., Buneva V.N. Prirodnye abzimyi krovi bolnykh shizofreniy s proteoliticheskoj aktivnostyu. Nauchnyye trudy V S'ezda fiziologov SNG, V S'ezda biohimikov Rossii [Natural abzymes of blood of schizophrenic patients with proteolytic activity. Scientific works of V Meeting of Physiologists of CIS]. *Acta Naturae.* 2016; Suppl: 43–44 (in Russian).
22. Parshukova D., Borodyuk Y., Smirnova L., Buneva V., Ivanova S., Semke A. The G-immunoglobulins of schizophrenic patients demonstrate proteolytic activity. *European Neuropsychopharmacology.* 2016; 26; Suppl 1: 20–21.
23. Sinyansky L.E., Mednova I.A., Ermakov E.A. Abzimyi s oksidoreduktaznoy aktivnostyu. Materialyi 54-y Mezhdunarodnoy nauchnoy studencheskoj konferentsii MNSK-2016 [Abzymes with oxidoreductase activity. Materials of the 54<sup>th</sup> International Scientific Students' Conference ISSC-2016]. M.: Meditsina, 2016: 25 (in Russian).
24. Sinyanskii L., Smirnova L., Krotenko N., Mednova I., Ermakov E., Titova M., Alifirova V., Semke A., Ivanova S. Immunoglobulins G with oxidoreductase activity of patients with schizophrenia and multiple sclerosis. DRAFT ABSTRACT BOOK of 13th ISNI Congress Jerusalem. 2016: 129–130.
25. Shchigoreva Yu.G., Smirnova L.P., Krotenko N.M., Boiko A.S., Kornetova E.G., Semke A.V. Aktivnost antioksidantnykh fermentov v eritrotsitakh perifericheskoy krovi u bolnykh shizofreniy s tardivnoy diskinezijey [Activity of antioxidant enzymes in erythrocytes of peripheral blood at patients with schizophrenia with tardive dyskinesia]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya – Current problems of Science and Education.* 2013; 5: 341 (in Russian).
26. Ivanova S. A., Smirnova L.P., Shchigoreva Yu.G., Boiko A.S., Semke A.V., Uzbekov M.G., Bokhan N.A. Aktivnost glyukozoz-6-fosfatdehidrogenazy i katalazy v eritrotsitakh bolnykh shizofreniy v dinamike farmakoterapii traditsionnyimi antipsihoticheskimi preparatami [Glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activities in erythrocytes of schizophrenic patients under pharmacotherapy with traditional antipsychotics]. *Neurohimiya – Neurochemical Journal.* 2014; 31 (1): 79–83 (in Russian).
27. Flatow J., Buckley P., Miller B. J. Meta-analysis of oxidative stress in schizophrenia. *Biological Psychiatry.* 2013; 74 (6): 400–409. doi 10.1016/j.biopsych.2013.03.018
28. Ng F. et al. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *International Journal of Neuropsychopharmacology.* 2008; 11 (6): 851–876. doi: 10.1017/S1461145707008401
29. Ivanova S.A., Smirnova L.P., Shchigoreva Yu.G., Semke A.V., Bokhan N.A. Glutatiton v syivorotke krovi bolnykh shizofreniy v dinamike antipsihoticheskoy terapii [Glutathione in serum of schizophrenic patients in dynamics of antipsychotic therapy]. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny – Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2015; 8 (160): 255–258 (in Russian).
30. Bergink V., Gibney S.M., Drexhage H.A. Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry.* 2014; 75 (4): 324–331. doi 10.1016/j.biopsych.2013.09.037
31. Boiko A.S., Losenkov I.S., Dmitrieva E.G. Primenenie multipleksnogo analiza v opredelenii perifericheskikh biomarkerov u bolnykh shizofreniy, dlitelno poluchayuschih antipsihoticheskuyu terapiyu [Use of multiplex analysis in identification of peripheral biomarkers in schizophrenic patients under long-term antipsychotic therapy]. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv – Development and Registration of Medicinal Agents.* 2016; 4 (17): 196–201 (in Russian).
32. Parshukova D.A. Issledovanie urovnya antitel k osnovnomu belku mielina u patsientov s shizofreniy i zdorovykh lits. Aktualnyye voprosy psixiatrii i narkologii: sbornik tezisov [Study of level of antibodies to myelin basic protein in schizophrenic patients and healthy persons. Relevant issues of psychiatry and addiction psychiatry: book of abstracts]. Tomsk: Publishing House “Ivan Fedorov”, 2016; 18: 125–126 (in Russian).
33. Dmitrieva E.M., Smirnova L.P., Loginova L.V., Seregin A.A., Dmitrieva E.G., Ivanova S.A. Analiz razlichiy v elektroforeticheskom raspredelenii belkov syivorotki krovi bolnykh shizofreniy i zdorovykh lits [The analysis of differences in electrophoretic the distribution of proteins in the blood serum of patients with schizophrenia and in the healthy persons] *Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki – Bulletin of Ural Medical Academic Science.* 2014; 3 (49): 209–210 (in Russian).
34. Tanaka H., Yoshimura Y., Nozaki M., Yomogida K., Tsuchida J., Tosaka Y., Habu T., Nakanishi T., Okada M., Nojima H., Nishimune Y. Identification and characterization of a haploid germ cell-specific nuclear protein kinase (Haspin) in spermatid nuclei and its effects on somatic cells. *J Biol Chem.* 1999; 274 (24): 17049–57.
35. Letova A.A., Dmitrieva E.M., Seregin A.A. Vyyavlenie potencialnykh biomarkerov shizofrenii. Materialyi 54-y Mezhdunarodnoy nauchnoy studencheskoj konferentsii MNSK-2016 [Detection of potential protein markers of schizophrenia. Materials of the 54<sup>th</sup> International Scientific Students' Conference ISSC-2016]. M.: Meditsina, 2016: 14 (in Russian).
36. Wiesmann C., Katschke K.J., Yin J., Helmy K.Y., Steffek M., Fairbrother W.J., McCallum S.A., Embuscado L., DeForge L., Hass P.E., van Lookeren Campagne M. Structure of C3b in complex with CR1g gives insights into regulation of complement activation. *Nature.* 2006; 444 (7116): 217–20.
37. Helmy K.Y., Katschke K.J.Jr., Gorgani N.N., Kljavin N.M., Elliott J.M., Diehl L., Scales S.J., Ghilardi N., van Lookeren Campagne M. CR1g: a macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. *Cell.* 2006; 124 (5): 915–27.
38. Letova A., Dmitrieva E., Seregin A. Detection of potential protein markers for schizophrenia. Abstract book of the International student congress of (Bio). *Medical Sciences.* 2016: 564.
39. Hammerschmidt C., Hallström T., Skerka C., Wallich R., Stevenson B., Zipfel P.F., Kraiczky P. Contribution of the infection-associated complement regulator-acquiring surface protein 4 (ErpC) to complement resistance of *Borrelia burgdorferi*. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012: 349657.
40. Lobacheva O.A., Vetlugina T.P., Semke A.V. Neuroimmunnye vzaimodeystviya pri shizofrenii [Neuroimmune interrelations in schizophrenia]. *Neuroimmunologiya - Neuroimmunology.* 2007; 2 (5): 74 (in Russian).
41. Dmitrieva E.M., Loginova L.V., Koval V.V., Smirnova L.P. Identifikatsiya razlichiy v belkovom spektre syivorotki krovi bolnykh shizofreniy i zdorovykh lits s pomoschyu MALDYTOF mass-spektrometrii. Aktualnyye voprosy psixiatrii i narkologii: sbornik tezisov XVII nauchnoy otchetnoy sessii NII psicheskogo zdorovya i II Rossiysko-kitayskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktualnyye voprosy biopsihosotsialnoy reabilitatsii patsientov s affektivnymi rasstroystvami» [Identification of differences in protein spectrum of serum of schizophrenic patients and healthy persons with use of MALDYTOF mass-spectrometry. Relevant issues of psychiatry and addiction psychiatry: book of abstracts of XVII Scientific Reporting Session of Mental Health Research Institute and II Russian–Chinese Scientific-Practical Conference “Relevant issues of biopsychosocial rehabilitation of patients with affective disorders”]. Tomsk, 2015; 96–98 (in Russian).
42. Tanaka H., Iguchi N., Isotani A., Kitamura K., Toyama Y., Matsuoka Y., Onishi M., Masai K., Maekawa M., Toshimori K., Okabe M., Nishimune Y. HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility. *Mol Cell Biol.* 2005; 25 (16): 7107–19.
43. Smirnova L.P., Loginova L.V., Dmitrieva E.M., Seregin A.A., Semke A.V., Simutkin G.G., Ivanova S.A. Pervyye rezultaty sravneniya proteomov syivorotki krovi bolnykh shizofreniy i bipolyarnym affektivnym rasstroystvom [The first results of comparison of blood serum proteomes of patients with schizophrenia and bipolar affective disorder]. *Sibirskiy vestnik psixiatrii i narkologii – Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry.* 2016; 2 (91): 42–47 (in Russian).

Received February 1.2018

Accepted April 2.2018

Smirnova Lyudmila P., PhD, senior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Parshukova Darya A., junior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Ermakov Evgeny A., assistant of the Department of Molecular Biology and Biotechnology of NSU, senior laboratory assistant of the Laboratory of Enzymes of Reparation, Institute of Chemical Biology and Basic Medicine, Novosibirsk, Russian Federation.

Dmitrieva Elena M., junior researcher of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Boiko Anastasia S., PhD, researcher of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Fedorenko Olga Yu., MD, lead researcher of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Loginova Larisa V., postgraduate student of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Krotenko Nina M., Candidate of Biological Sciences, researcher of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; senior lecturer of Department of Normal Physiology of SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Seregin Alexander A., postgraduate student of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

Letova Anastasia A., student of SSMU, Tomsk Russian Federation.

Sinyansky Lev E., intern of SSMU, Tomsk, Russian Federation.

Kornetova Elena G., MD, lead researcher of Endogenous Disorders Department, Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; liaison-psychiatrist of clinics of SSMU, Tomsk, Russian Federation

Ivanova Svetlana A., MD, Professor, Deputy Director for Research, Head of the Laboratory of Molecular Genetics and Biochemistry of Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation.

✉ Smirnova Lyudmila P., lpsmirnova@yandex.ru