

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛКОВ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ

Лариса Викторовна ЛОГИНОВА^{1,2,3}, Людмила Павловна СМИРНОВА¹,
Владимир Васильевич КОВАЛЬ^{2,3}, Ольга Семёновна ФЁДОРОВА^{2,3},
Аркадий Валентинович СЕМКЕ¹, Светлана Александровна ИВАНОВА¹

¹ НИИ психического здоровья СО РАМН
634014, г. Томск, ул. Алеутская, 4

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 8

³ ГОУ ВПО Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

В работе представлены различия в протеомном составе крови, выявленные путем масс-спектрометрического анализа и электрофоретического разделения белков сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц. При электрофоретическом анализе сыворотки крови больных шизофренией получены различия в сравнении с контрольной группой в белковом спектре следующих областей молекулярных масс, кДа: 165–195, 70–130, 40–45, < 25. В сыворотке крови больных шизофренией выявлены 5 белков, не встречающихся у здоровых лиц: тирозинкиназа (ЕС 2.7.1.112) – 128263 Да, ядерный клеточно-специфичный эпителиальный гаплоидный белок 1 – 25933 Да, цинк-связывающий белок 747 – 20597 Да и два белка с неизвестными функциями (гипотетический белок LANCL1 – 45711 Да и гипотетический белок DP1 участка *Polypsis coli* – 21135 Да).

Ключевые слова: шизофрения, протеомика, MALDI-TOF-масс-спектрометрия.

В настоящее время активно развиваются новые подходы к диагностике психических заболеваний, использующие достижения и методы протеомики – науки, которая занимается выявлением, регистрацией и созданием банков данных всех белков в клетке [1, 2]. Протеомика ставит своей целью исчерпывающую идентификацию сложных белковых образцов. Понимание протеомных процессов на уровне клетки необходимо для раскрытия патогенеза и будет способствовать появлению новых методов диагностики социально значимых заболеваний, а также анализа перспективных мишеней для разработки новых лекарственных препаратов [3].

В клинической психиатрии шизофрения является одной из актуальных проблем вследс-

твие преобладания по распространенности, тяжести социальных последствий и высоких показателей инвалидизации, наступающей в молодом возрасте. Этиология и патогенез шизофрении не известны. Существует множество гипотез возникновения этой болезни. Одна из них, аутоинтоксикационная, позволяет сделать предположение о том, что в основе развития шизофрении могут лежать нарушение белкового обмена и накопление в организме больных разнообразных белковых продуктов. Тем не менее до сих пор не удалось обнаружить признаки наличия биохимических сдвигов или маркерных белков, отличающихся особой специфичностью, свойственных только больным шизофренией [4].

Логина Л.В. – аспирант, e-mail: L.V.Loginova@mail.ru

Смирнова Л.П. – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных и молекулярно-биологических исследований

Коваль В.В. – к.х.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории исследования модификации биополимеров

Федорова О.С. – д.х.н., проф., зав. лабораторией исследования модификации биополимеров

Семке А.В. – д.м.н., проф., руководитель отделения эндогенных расстройств

Иванова С.А. – д.м.н., проф., зав. лабораторией клеточных и молекулярно-биологических исследований, e-mail: Svetlana@mail.tomsknet.ru

В современных протеомных исследованиях выделены из ткани мозга умерших больных шизофренией комплексы патологически измененных белков [5]. Аномальные белки, типичные для шизофрении, встречаются не только в мозге, но также в ткани печени и эритроцитах [6]. Некоторые исследования демонстрируют потенциал спинно-мозговой жидкости в качестве источника нейроспецифических биомаркеров [7]. Выявление белка-маркера, или регуляторных белков, участвующих в патогенезе шизофрении и других психических расстройств, в доступном для использования в диагностических целях биоматериале (сыворотке крови) позволит создать основу для разработки методов прогнозирования риска развития психических заболеваний и методов эффективной терапии, что значительно увеличит качество жизни и долгосрочный прогноз у пациентов [8, 9].

Сыворотка крови доступна и удобна для использования в диагностических целях. Помимо основных сывороточных белков в ней содержатся в небольших количествах белки различных тканей, попадающие в результате разрушения клеток при различных заболеваниях. Сыворотка находится в состоянии динамического равновесия, и любой сдвиг этого равновесия отражает изменение в функционировании организма. Исследование белкового спектра сыворотки крови особенно значимо для диагностики патологических состояний, сопровождающихся нарушениями обмена белков. При многих заболеваниях в сыворотке крови изменяется соотношение отдельных белков (диспротеинемия), несмотря на то, что общее содержание белка может остаться нормальным [10, 11].

В связи с вышеизложенным поиск специфических маркеров в протеоме, характерных для шизофрении, является актуальным.

Целью данного исследования является изучение различий в электрофоретическом распределении и сравнительный качественный анализ белков сыворотки крови больных шизофренией и здоровых людей, идентифицированных на масс-спектрометре MALDI-TOF.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В рамках данного исследования было обследовано 8 пациентов в возрасте от 18 до 55 лет (средний возраст – $36,5 \pm 15,1$ года), из них 3 женщины и 5 мужчин. Длительность заболевания составила от 8 до 37 лет, средняя продолжительность заболевания – $21,8 \pm 15,8$ года. Все пациенты проходили курс стационарного лечения в отделении эндогенных расстройств

НИИ психического здоровья СО РАМН. Диагностическая оценка и клиническая квалификация расстройств проводилась в соответствии с Международной статистической классификацией болезней, травм и причин смерти 10-го пересмотра (МКБ-10), шифр F2. Клинико-нозологическая структура представлена следующими расстройствами: один пациент имел диагноз недифференцированная шизофрения (МКБ-10 F20.3), у двух пациентов диагностирована простая шизофрения (МКБ-10 F20.60), у четырех – параноидная шизофрения (МКБ-10 F20.00) и у одного пациента – шизоаффективное расстройство (МКБ-10 F25.0). В группу контроля вошли 8 психически и соматически здоровых лиц, соответствующих по полу и возрасту. Все больные и испытуемые из контрольной группы дали информированное согласие на участие в клиническом исследовании. Исследование проведено с соблюдением протокола, утвержденного комитетом по биомедицинской этике НИИ психического здоровья СО РАМН и в соответствии с Хельсинкской Декларацией.

У обследуемых лиц брали кровь из локтевой вены утром натощак в пробирки типа Vacuette с активатором образования сгустка. Для отделения сыворотки крови от форменных элементов пробирку с кровью центрифугировали при 1500 об/мин 30 мин.

Анализ протеома осложнен присутствием в сыворотке крови мажорных белков в очень высокой концентрации. С целью отделения 6 мажорных белков (альбумина, иммуноглобулина G, иммуноглобулина A, антитрипсина, трансферина и гаптоглобина) в исследуемой сыворотке после 5-кратного разведения фосфатно-солевым буфером, центрифугирования и фильтрования через стандартный фильтр диаметром 22 мкм была использована аффинная хроматография на хроматографе фирмы Agilent Technologies (США). Аффинная хроматография – разновидность лигандной хроматографии. В основе последней лежит реакция взаимодействия разделяемых примесей с лигандом, связанным с инертным носителем. В случае аффинной хроматографии в роли примесей выступают биологически активные вещества (белки, ферменты), вступающие с лигандом в специфическое биохимическое взаимодействие (анти-тело-антиген). Именно высокая специфичность подобного взаимодействия обуславливает высокую эффективность аффинной хроматографии.

Фракции белков, не связавшиеся с аффинным сорбентом, концентрировали до 1 мл с помощью ультрафильтрации через фильтры Мик-

рон-ультра (MILLIPORE, Франция) на 5 кДа. В настоящее время большая часть работ в протеомике выполняется с использованием электрофоретического разделения. Электрофорез позволяет выявить индивидуальные вариации протеома, оценить статистические параметры для каждого пятна. Затем, сравнивая усредненные электрофореграммы между группами, удается выявить различия, связанные с заболеванием. Различия заключаются в повышении или понижении экспрессии белка, некоторые белки появляются в плазме больных, тогда как другие могут исчезнуть [12].

Анализ концентрированных белков осуществляли с использованием электрофоретического разделения в 12 % ПААГ по методу Laemmli [13] в градиенте додецилсульфат натрия – ПААГ с окраской coomassie brilliant blue. Процедуру электрофоретического разделения проводили с использованием прибора Protean II xi Cell (Bio-Rad, США). Затем выполняли трипсинолиз белка в геле. Белковые пятна в геле помещали в пробирки, в которые добавляли 30 мкл смеси, содержащей 50 % ацетонитрила и 5 % муравьиной кислоты. Полученную смесь интенсивно перемешивали на вортексе в течение 5 мин. Супернатант использовали в качестве исследуемого образца для проведения масс-спектрометрического анализа.

Подготовленные таким образом белковые экстракты вносили в лунки стального планшета для MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Метод масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF основан на разделении ионов исследуемого вещества по величинам m/e (отношение массы иона m к его заряду e) и измерении этих величин.

Для анализа использовали 1 мкл образца, смешивая его с эквивалентным объемом насыщенного раствора матрицы-НССА-в растворе, содержащем 50 % ацетонитрила и 0,1 % трифторуксусной кислоты [14]. В качестве контрольного образца, а также внешнего калибратора использовался стандартный набор белков фирмы «Bruker Daltonics» (Германия). Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF-масс-спектрометра Autoflex II («Bruker Daltonics»). Для получения каждого масс-спектра использовали от 1400 до 2000 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции – ионизации образца. Для каждого образца записывали спектр, полученный в результате суммирования 10 одиночных спектров (1400–2000 импульсов лазера). Для записи исполь-

зовали 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 после трипсинолиза проводили с использованием опции Peptide Fingerprint программы Mascot (www.matrixscience.com, «Matrix Science», США). Были заданы следующие параметры поиска: точность определения массы 100 миллионных долей, таксон *Homo sapiens*. Погрешность определения масс ионов пептидных фрагментов составляла примерно 0,03 %.

При проведении статистической обработки результатов электрофоретического исследования достоверность различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера, статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате нашего исследования выявлены различия в электрофоретическом распределении белков у больных шизофренией, в отличие от группы здоровых лиц, представленные на рисунке. Зависимости в изменениях белкового спектра от пола, возраста и длительности заболевания не получено.

При электрофоретическом анализе сыворотки крови больных шизофренией обнаружены различия в сравнении с контрольной группой в белковом спектре следующих областей молекулярных масс: 165–195 кДа, 70–130 кДа, 40–45 кДа, < 25 кДа (табл. 1).

Выявленные изменения в спектре распределения белков могут носить как качественный,

Таблица 1

Различия, выявленные при анализе электрофореграммы белков сыворотки крови больных шизофренией и здоровых лиц

Молекулярная масса белков, кДа	Шизофрения	Контроль
165–195	Интенсивная полоса шириной 30–40 кДа	Полоса отсутствует либо узкая (5 кДа)
70–110	3–4 полосы разной интенсивности	1–2 полосы шириной 90–98 кДа
40–45	Широкая интенсивная полоса или две узких	Одна менее интенсивная полоса
< 25	До четырех узких полос	1–2 полосы средней интенсивности

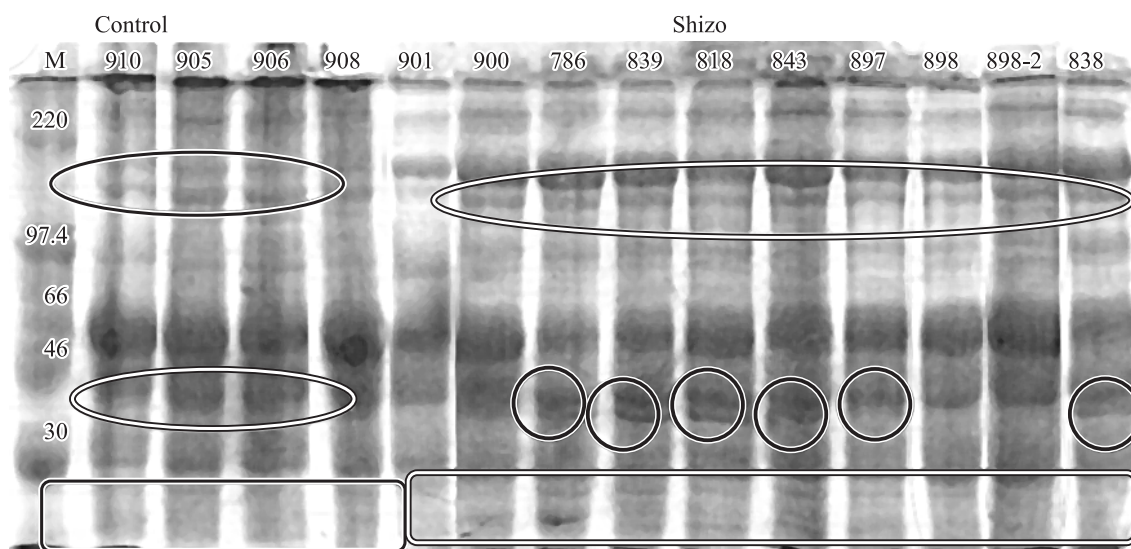


Рис. Различия в электрофоретическом распределении белков при шизофрении

так и количественный характер и быть обусловлены различными причинами – от изменения конформационной структуры белков до появления белков, свойственных данному патологическому процессу. Известно, что при шизофрении наблюдается интенсивная генерация свободнорадикальных продуктов, усиление перекисного окисления липидов, повышение окислительной деструкции белков, что приводит к нарушению структуры, функции клеточных мембран и, соответственно, рецепторного аппарата или нарушение метаболизма самих гормонов и нейротрансмиттеров, вызванное усилением свободнорадикальных процессов [15].

При дальнейшем анализе полученных данных выявлены значимые различия масс-спектрометрических белковых профилей сыворотки крови больных шизофренией и здоровых людей. В табл. 2 представлены белки, выделенные из сыворотки крови у больных шизофренией, не встречающиеся у здоровых лиц и имеющих Score больше 40. В таблицу не включены белки, имеющие более низкое значение Score.

В области 130 кДа у больных шизофренией обнаружена тирозинкиназа (EC 2.7.1.112) – 128263 Да, не встречающаяся у здоровых лиц. Активность этого фермента в кровеносном русле увеличивается в результате повреждения ДНК, а также некоторыми химическими сигналами, в том числе cAMP, cGMP, диацилглицеролом, Ca^{2+} -кальмодулином, эти сигнальные молекулы появляются при активации всех кальций-зависимых процессов, запускаемых в том числе и окислительным стрессом. Окислительный стресс принимает участие в патогенезе нейродегенеративных заболеваний [16, 17].

В области 40–45 кДа у больных шизофренией обнаружен неидентифицированный белок LANCL1 – 45711 Да с неизвестной функцией, не встречающийся у здоровых лиц. В области >25 кДа выявлен ядерный клеточно-специфичный эпителиальный гаплоидный белок 1 – 25933 Да, в области <25 кДа – цинк-связывающий белок 747 – 20597 Да и гипотетический белок DP1 участка *Polypsis coli* – 21135 Да, также встречающиеся только у больных.

Таблица 2

Белки сыворотки крови больных шизофренией, не встречающиеся у здоровых лиц (достоверность различий $p < 0,05$)

Молекулярная масса, Да	Score	Международное название белка
20597	46	Zinc finger protein 747 (Q9BV97_HUMAN)
21135	65	Polypsis coli region hypothetical protein DP1 (A39658_HUMAN)
25933	53	Haploid germ cell-specific nuclear protein 1 (Q75WM6_HUMAN)
45711	66	Hypothetical protein LANCL1 (Q86VR7_HUMAN)
128263	47	Protein-tyrosine kinase (EC 2.7.1.112) (A35962_HUMAN)

Возможно, идентифицированные белки могут играть роль маркеров или регуляторных белков, участвующих в патогенезе шизофрении. Необходимо проведение дальнейших исследований с увеличением количества обследованных больных шизофренией.

ВЫВОДЫ

1. При электрофоретическом анализе белкового спектра сыворотки крови больных шизофренией в сравнении с контрольной группой получены отличия в следующих областях молекулярных масс: 165–195 кДа, 70–130 кДа, 40–45 кДа, < 25 кДа.

2. В сыворотке крови больных шизофренией выявлены 5 белков, не встречающихся у здоровых лиц: тирозинкиназа (ЕС 2.7.1.112) – 128263 Да, ядерный клеточно-специфичный эпителиальный гаплоидный белок 1 – 25933 Да, цинк-связывающий белок 747 – 20597 Да и два белка с неизвестными функциями (гипотетический белок LANCL1 – 45711 Да и гипотетический белок DP1 участка *Polypsis coli* – 21135 Да).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках междисциплинарного интеграционного проекта СО РАН № 90 и поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (государственный контракт 14.740.12.0819).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. М.: Техносфера, 2007. 368–369.
- Sarvilina I.V., Karkishchenko V.N., Gorshkova Yu.V. Interdisciplinary research in medicine // М.: Tekhnosfera, 2007. 368–369.
2. Hamacher M., Meyer H.E. HUPO Brain Proteome Project: aims and needs in proteomics // Expert Rev. Proteomics. 2005. 2. 1–3.
3. Filiou M.D., Turck C.W., Martins-de-Souza D. Quantitative proteomics for investigating psychiatric disorders // Proteomics Clin. Appl. 2011. 5. 38–49.
4. Pickard B. Progress in defining the biological causes of schizophrenia // Expert Rev. Mol. Med. 2011. 28. 25–26.

5. Föcking M., Dicker P., English J.A. et al. Common proteomic changes in the hippocampus in schizophrenia and bipolar disorder and particular evidence for involvement of cornu ammonis regions 2 and 3 // Arch. Gen. Psychiatry. 2011. 68. 477–488.
6. Prabakaran S., Wengenroth M., Lockstone H.E. et al. 2-D DIGE analysis of liver and red blood cells provides further evidence for oxidative stress in schizophrenia // J. Proteome Res. 2007. 6. 141–149.
7. Lakhan S.E. Schizophrenia proteomics: biomarkers on the path to laboratory medicine? // Diagn. Pathol. 2006. 1. 11–12.
8. Berrettini W.H. Are schizophrenic and bipolar disorders related? A review of family and molecular studies // Biol. Psychiatry. 2000. 48. 531–538.
9. English J.A., Pennington K., Dunn M.J., Cotter D.R. The neuroproteomics of schizophrenia // Biol. Psychiatry. 2011. 69. 163–72.
10. Dudley E., Hässler F., Thome J. Profiling for novel proteomics biomarkers in neurodevelopmental disorders // Expert Rev. Proteomics. 2011. 8. 127–136.
11. Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium // Nat. Genet. 2000. 25. 25–29.
12. Swatton J.E., Prabakaran S., Karp N.A. et al. Protein profiling of human postmortem brain using 2-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis (2-D DIGE) // Mol. Psychiatry. 2004. 9. 128–143.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. 1970. 227. 680–685.
14. Gobom J., Schuerenberg M., Mueller M. et al. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation. A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics // Anal. Chem. 2001. 73. 434–438.
15. Fendri C., Mechri A., Khiari G. et al. Oxidative stress involvement in schizophrenia pathophysiology: a review // Encephale. 2006. 32. 244–252.
16. Chiueh C.C., Andoh T., Lai A.R. et al. Neuroprotective strategies in Parkinson's disease: protection against progressive nigral damage induced by free radicals // Neurotox. Res. 2000. 2. 293–310.
17. Yao J.K., Reddy R. Oxidative stress in schizophrenia: pathogenetic and therapeutic implications // Antioxid. Redox Signal. 2011. 15. 1999–2002.

MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF SERUM PROTEINS IN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

Larisa Viktorovna LOGINOVA^{1,2,3}, Lyudmila Pavlovna SMIRNOVA¹,
Vladimir Vasilevich KOVAL^{2,3}, Olga Semenovna FEDOROVA^{2,3},
Arkadiy Valentinovich SEMKE¹, Svetlana Aleksandrovna IVANOVA¹

¹ Institute for Mental Health SB RAMS
634014, Tomsk, Aleutskaya str., 4

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrent'ev av., 8

³ Novosibirsk State University
630090, Novosibirsk, Pirogov str., 2

The differences in electrophoretic distribution of serum proteins and comparative proteomic analysis of serum proteins of patients with schizophrenia and healthy individuals have been studied. At electrophoretic analysis of serum from patients with schizophrenia, differences as compared with control group in the protein spectrum of molecular weights of the following areas have been obtained: 165–195 kDa, 70–130 kDa, 40–45 kDa, < 25 kDa. In serum of the patients with schizophrenia, 5 proteins have been identified which have not been found in healthy individuals: polyposis coli region hypothetical protein DP1(21135 kDa), Haploid germ cell-specific nuclear protein 1 (25933 kDa), Tyrosine-protein kinase 1 (128263 kDa), two proteins with unknown functions: protein-AAH12461 (BC012461 kDa), LOC protein-147645 (45711 kDa).

Keywords: schizophrenia, proteome, MALDI-TOF-MS.

Loginova L.V. – postgraduate student, e-mail: L.V.Loginova@mail.ru

Smirnova L.P. – candidate of medical sciences, senior researcher of the laboratory for cellular and molecular biological investigation

Koval V.V. – candidate of chemical sciences, senior researcher of the laboratory for biopolymers modification investigation

Fedorova O.S. – doctor of chemical sciences, professor, head of the laboratory for biopolymers modification investigation

Semke A.V. – doctor of medical sciences, professor, head of the department of endogenic disorders

Ivanova S.A. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory for cellular and molecular biological investigations, e-mail: Svetlana@mail.tomsknet.ru