

Количественные различия в белковом спектре сыворотки крови больных БАР с депрессивным и смешанным эпизодом

Серегин А.А.^{1*}, Смирнова Л.П.¹, Дмитриева Е.М.¹, Завьялова М.Г.²,
Рыжкова А.Ю.³, Иванова С.А.¹

¹ Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, НИИ психического здоровья, Томск, Россия

² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

³ Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

* apocalips1991@mail.ru

Ключевые слова: биполярное аффективное расстройство; протеом; масс-спектрометрия, биомаркеры, сыворотка крови

Мотивация и цель: Диагностика биполярного аффективного расстройства (БАР) является довольно трудной задачей так как БАР нередко имеет сходную клиническую картину с другими психическими расстройствами (ПР), а лабораторные критерии дифференциальной диагностики отсутствуют [1]. Симптоматика гипомании при униполярной депрессии со смешанными чертами имеет схожие клинические симптомы с гипоманией при БАР [2]. При лечении антидепрессантами предполагаемой униполярной депрессии со смешанными чертами есть большая вероятность ее трансформации в эпизод мании или гипомании при БАР [3]. Это связано с недостаточным пониманием механизмов патогенеза БАР и выявление регуляторных белков, участвующих в патогенезе БАР, в доступном для использования в диагностических целях биоматериале – сыворотке крови, не только приблизит к пониманию патогенетических механизмов БАР, но и поможет в разработке новых методов диагностики и патогенетически обоснованных методов терапии [4].

Методы и алгоритмы: В работе проанализировали образцы сыворотки крови 59 пациентов с БАР (13 мужчин и 46 женщин) в возрасте 37 [26; 51] лет и продолжительностью болезни 7 [3; 15] лет. Из данной группы 30 пациентов обратились в стационар по поводу текущего эпизода легкой или умеренной депрессии (F31.3), а 29 пациентов по поводу текущего эпизода смешанного характера (F31.6). Группу контроля составили 43 психически и соматически здоровых добровольцев, соответствующих полу и возрасту обследуемой группе. Забор крови, проводился до начала терапии. Из данной выборки масс-спектрометрическому анализу была подвергнута сыворотка крови 10 человек больных БАР и 5 здоровых лиц. Сыворотка при помощи аффинной хроматографии очищалась от 14 мажорных белков (колонка Multiple Affinity Removal Column Human 14, Agilent). Полученные образцы разделяли 1D электрофорезом в 12 % полиакриламидном геле по методу Леммли. Далее после трипсинолиза и экстракции пептидов из геля были получены спектры масс белков при помощи ВЭЖХ/масс-спектрометрии с использованием системы ВЭЖХ Ultimate 3000 Nano

LC (Thermo Scientific), соединенной с масс-спектрометром Q Exactive HF-X – Orbitrap (Thermo Fischer Scientific) на базе ЦКП передовой масс-спектрометрии Центра исследовательской инфраструктуры Сколковского института науки и технологий, г. Москва. Идентификация белков проводилась с использованием базы данных UniProtKB/Swiss-Prot (www.uniprot.org) и поисковой машины Mascot (www.matrixscience.com). Методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в образцах сыворотки крови больных БАР и здоровых лиц было определено количество следующих белков: альфа-актин-2 (α -SMA, α -Smooth Muscle Actin, E01S0004 Cloud-Clone Corp., США); дермцидин (DCD, Dermcidin, SEC896Hu Cloud-Clone Corp., США); белок родственного рецептору липопротеинов низкой плотности/мегалин (Low Density Lipoprotein Receptor Related Protein 2 (LRP2, WED101Hu Cloud-Clone Corp., USA). Количество перечисленных белков измеряли согласно протоколу производителя наборов ИФА на многорежимном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США) на базе ЦКП «Медицинская геномика» (ТНИМЦ). Статистическую значимость результата ИФА проверяли с помощью непараметрического анализа ANOVA (критерий Краскела-Уоллиса) для трех независимых групп и критерия Манна-Уитни для двух независимых групп.

Результаты: В результате масс-спектрометрического анализа было выявлено около 1600 белков в каждой исследуемой группе. При сопоставлении протеомов у пациентов с БАР был идентифицирован 21 дифференциально экспрессируемый патогенетически значимый белок. Данные белки являются структурными элементами цитоскелета и мембранных рецепторов, участвуют в регуляции синтеза ДНК и клеточного цикла, дифференцировке нервных клеток и процессах транспорта через клеточную мембрану. Для нескольких из выявленных белков уже установлено участие в патогенезе психических расстройств. Для дальнейшего количественного анализа были выбраны три наиболее интересных белка: α -SMA, DCD и LRP2. При помощи статистического анализа ANOVA (критерий Краскела–Уоллиса) были обнаружены статистически значимые различия между подгруппами больных БАР с текущим депрессивным и смешанным эпизодом, а также со здоровыми лицами в содержании белков LRP2 ($p = 0,016$) и DCD ($p = 0,049$). При попарном сравнении исследуемых подгрупп при помощи критерия Манна–Уитни выявлено что разница в содержании этих белков возникает за счет повышения уровня LRP2 ($p = 0,006$) и DCD ($p = 0,027$) у больных БАР с текущим депрессивным эпизодом в сравнении со здоровыми лицами. Так дермцидин (DCD) активирует репарацию нейронов в случае их повреждения [4]. Известно, что прекурсор дермцидина – пептид Y-P30 [5] оказывает нейропротекторное действие [6] и способствует росту нейритов из нейронов-предшественников таламуса и мозжечка [7]. LRP2 в свою очередь регулирует развитие и миграцию нейрональных стволовых клеток, расположенных в двух ключевых нишах взрослого организма: субвентрикулярной зоне боковых желудочков и зубчатой извилине гиппокампа, а также может играть регенеративную и проективную роль при повреждении нейронов [9]. Несмотря на то, что анализ ANOVA не выявил статистически значимых различий в содержании альфа-актина-2 в исследуемых подгруппах, при попарном сравнении выявлено значительное повышение этого белка у больных БАР с текущим смешанным эпизодом в сравнении со здоровыми лицами (Mann–Whitney U Test, $p = 0,0422$). Существует предположение о возможном участии этого белка в регуляции проводимости NMDA-рецепторов

[10]. Также известно, что лечение литием снижает уровни экспрессии α -SMA [11]. По анамнестическим данным включенные в эксперимент пациенты не принимали лечение как минимум на протяжении двух месяцев до поступления.

Выводы: Обнаруженное в данной работе повышенное содержание LRP2 и DCD у больных БАР с текущим депрессивным эпизодом может указывать на запуск защитных нейропротективных механизмов в ответ на повреждение нейронов в процессе патогенеза БАР, однако нейропротективная роль данных белков в патогенезе БАР требует детального изучения. Нейропротективное действие DCD а также возможное участие α -SMA в регуляции проводимости NMDA-рецепторов позволяет предложить данные белки в качестве потенциального биомаркера БАР при более подробном изучении их патогенетической роли при БАР.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 23-75-00023.

Quantitative differences in the protein spectrum of blood serum of patients with bipolar disorder with depressive and mixed episodes

Seregin A.A.^{1*}, Smirnova L.P.¹, Dmitrieva E.M.¹, Zavyalova M.G.², Ryzhkova A.Yu.³, Ivanova S.A.¹

¹ Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Mental Health Research Institute, Tomsk, Russia

² Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

³ Siberian State Medical University, SSMU, Tomsk, Russia

* ivanov@bionet.nsc.ru

Key words: bipolar disorder; proteome; mass spectrometry, biomarkers, blood serum

Motivation and Aim: Diagnosis of bipolar disorder (BD) is a rather difficult task since BD often has a similar clinical picture with other mental disorders (MD), and laboratory criteria for differential diagnosis are lacking [1]. The symptoms of hypomania in unipolar depression with mixed features have similar clinical symptoms to hypomania in bipolar disorder [2]. When treated with antidepressants for suspected unipolar depression with mixed features, there is a high probability of its transformation into an episode of mania or hypomania in BD [3]. This is due to insufficient understanding of the mechanisms of BD pathogenesis. Identification of regulatory proteins involved in the pathogenesis of BD in biomaterial available for diagnostic purposes – blood serum – will not only bring us closer to understanding the pathogenetic mechanisms of BD, but will also help in the development of new pathogenetically based methods of diagnosis and therapy [4].

Methods and Algorithms: The study analyzed blood serum samples from 59 patients with BD (13 men and 46 women) aged 37 [26; 51] years and disease duration 7 [3; 15] years. Of this group, 30 patients visited the hospital for a current episode of mild or moderate depression (F31.3), and 29 patients for a current mixed episode (F31.6). The control group consisted of 43 mentally and somatically healthy volunteers corresponding to the gender and age of the study group. Blood sampling was carried out before the start of therapy. From this sample, the blood serum of 10 people with BD and 5 healthy individuals was subjected to mass spectrometric analysis. The serum was purified from

14 major proteins using affinity chromatography (Multiple Affinity Removal Column Human 14, Agilent). The resulting samples were separated by 1D electrophoresis in a 12 % polyacrylamide gel according to the Laemmli method. Next, after trypsinolysis and extraction of peptides from the gel, protein mass spectra were obtained by HPLC/mass spectrometry using an Ultimate 3000 Nano LC HPLC system (Thermo Scientific) coupled to a Q Exactive HF-X – Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific) based on the Advanced Mass Spectrometry Core Facility of Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow. Protein identification was performed using the UniProtKB/Swiss-Prot database (www.uniprot.org) and the Mascot search engine (www.matrixscience.com). Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the levels of the following proteins were determined in blood serum samples of patients with bipolar disorder and healthy individuals: Actin, aortic smooth muscle (a-SMA, a-Smooth Muscle Actin, E01S0004 Cloud-Clone Corp., USA); dermcidin (DCD, Dermcidin, SEC896Hu Cloud-Clone Corp., USA); Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (LRP2) WED101Hu Cloud-Clone Corp., USA). The level of the listed proteins was measured according to the protocol of the manufacturer of ELISA kits on a multimode reader Varioskan LUX (Thermo Scientific, USA) on the basis of the Medical Genomics Center (Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences). The statistical significance of the ELISA result was tested using nonparametric ANOVA analysis (Kruskal-Wallis test) for three independent groups and the Mann-Whitney test for two independent groups.

Results: As a result of mass spectrometric analysis, about 1600 proteins were identified in each study group. Comparison of proteomes in patients with BD identified 21 differentially expressed pathogenetically significant proteins. These proteins are structural elements of the cytoskeleton and membrane receptors; they are involved in the regulation of DNA synthesis and the cell cycle, differentiation of nerve cells and transport processes across the cell membrane. Several identified proteins have already been shown to be involved in the pathogenesis of mental disorders. The three most interesting proteins were selected for further quantitative analysis: a-SMA, DCD, and LRP2. Using ANOVA statistical analysis (Kruskal–Wallis test), statistically significant differences were found between the subgroups of patients with bipolar disorder with a current depressive and mixed episode, as well as with healthy individuals in the content of LRP2 ($p = 0.016$) and DCD ($p = 0.049$) proteins. When pairwise comparison of the studied subgroups using the Mann–Whitney test, it was revealed that the difference in the content of these proteins arises due to an increase in the level of LRP2 ($p = 0.006$) and DCD ($p = 0.027$) in patients with bipolar disorder with a current depressive episode in comparison with healthy individuals. Thus, dermcidin (DCD) activates the repair of neurons in case of their damage [4]. It is known that the precursor of dermcidin, the Y-P30 peptide [5], has a neuroprotective effect [6] and promotes the growth of neurites from the precursor neurons of the thalamus and cerebellum [7]. LRP2, in turn, regulates the development and migration of neuronal stem cells located in two key niches of the adult body: the subventricular zone of the lateral ventricles and the dentate gyrus of the hippocampus, and can also play a regenerative and projective role in neuronal damage [9]. Even though ANOVA analysis did not reveal statistically significant differences in the content of α -SMA in the studied subgroups, pairwise comparison revealed a significant increase in this protein in patients with bipolar disorder with a current mixed episode compared with healthy individuals (Mann–Whitney U Test, $p = 0.0422$). There is an assumption about the possible participation of this protein in the regulation of the

conductivity of NMDA receptors [10]. Lithium treatment is also known to reduce α -SMA expression levels [11]. According to anamnestic data, the patients included in the experiment did not take treatment for at least 2 months before admission.

Conclusion: The increased content of LRP2 and DCD found in this work in BD patients with a current depressive episode may indicate the launch of protective neuroprotective mechanisms in response to neuronal damage during the pathogenesis of BD, however, the neuroprotective role of these proteins in the pathogenesis of BD requires detailed study. The neuroprotective effect of DCD as well as the possible involvement of α -SMA in the regulation of NMDA receptor conductance allows us to propose these proteins as a potential biomarker of BD with a more detailed study of their pathogenetic role in BD.

Funding: The study is supported by Grant of RSF No. 23-75-00023.

Список литературы/References

1. Geoffroy P.A., Leboyer M., Scott J. Predicting bipolar disorder: what can we learn from prospective cohort studies? *Encephale*. 2015;41:10-16. doi 10.1016/j.encep.2013.05.004
2. Benazzi F. Mixed depression: a clinical marker of bipolar II disorder. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol Psychiatry*. 2005;29:267-274
3. Bottlender R. et al. Mixed depressive features predict maniform switch during treatment of depression in bipolar I disorder. *J Affect Disord*. 2004;78:149-152
4. Lee Motoyama J.P. et al. Identification of dermcidin in human gestational tissue and characterization of its proteolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357:828-833
5. Cunningham T.J. et al. Identification of the human cDNA for new survival/evasion peptide (DSEP): studies *in vitro* and *in vivo* of overexpression by neural cells. *Exp Neurol*. 2002;177:32-39
6. Macharadze T. et al. Y-P30 confers neuroprotection after optic nerve crush in adult rats. *Neuroreport*. 2011;22:544-547
7. Landgraf P. et al. The survival-promoting peptide Y-P30 enhances binding of pleiotrophin to syndecan-2 and -3 and supports its neuritogenic activity. *J Biol Chem*. 2008;283:25036-25045
8. Pollen A.A. et al. Molecular identity of human outer radial glia during cortical development. *Cell*. 2015;1(163):55-67
9. O'Rourke M. et al. Adult myelination: wrapping up neuronal plasticity. *Neural Regen Res*. 2014;9(13):1261-1264. doi 10.4103/1673-5374.137571
10. Логинова Л.В. Связь белков сыворотки крови, выявленных с помощью протеомного анализа, с особенностями патогенеза психогенных и эндогенных психических расстройств: дис. ... канд. мед. наук. Томск, 2018
11. Chen P.-H., Chung C.-C., Liu S.-H., Kao Y.-H., Chen Y.-J. Lithium treatment improves cardiac dysfunction in rats deprived of rapid eye movement sleep. *Int J Mol Sci*. 2022;23:11226. doi 10.3390/ijms231911226