

1 – НИИ психического здоровья, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, 634014, Россия, г. Томск, ул. Алеутская, 4

1 – Mental Health Research Institute, Tomsk national research medical center of the Russian Academy of Sciences, Aleutskaya street, 4, Tomsk, 634014, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: anastasya-iv@yandex.ru

Тел.: 8 (3822) 72 43 49

ПРИМЕНЕНИЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОГО АНАЛИЗА В ОПРЕДЕЛЕНИИ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ, ДЛИТЕЛЬНО ПОЛУЧАЮЩИХ АНТИПСИХОТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ

А.С. Бойко^{1*}, И.С. Лосенков¹, Е.Г. Дмитриева¹

Резюме. Проведено комплексное клинико-биологическое исследование 115 больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию. Концентрации мозгового нейротрофического фактора (BDNF) и пролактина в сыворотке крови у больных шизофренией и здоровых лиц определяли на мультиплексном анализаторе MAGPIX (Luminex, США) с использованием наборов MILLIPLEX® MAP (Merck, Германия). Выявлено, что концентрация BDNF статистически значимо коррелировала с выраженностью позитивной симптоматики у больных шизофренией. Индуцированная антипсихотическими препаратами гиперпролактинемия диктует необходимость мониторинга уровня пролактина для разработки персонализированных подходов к терапии и повышения качества жизни пациентов.

Ключевые слова: мозговой нейротрофический фактор, пролактин, шизофрения, мультиплексный анализ, антипсихотическая терапия.

MULTIPLEX ANALYSIS OF PERIPHERAL BIOMARKERS IN SCHIZOPHRENIC PATIENTS WITH LONG-TERM ANTIPSYCHOTIC THERAPY

A.S. Boiko^{1*}, I.S. Losenkov¹, E.G. Dmitrieva¹

Abstract. Complex clinical and biological study of 115 schizophrenic patients with long-term antipsychotic treatment was carried out. Concentrations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and prolactin levels in blood serum in schizophrenic patients and healthy subjects were determined to multiplex analyzer MAGPIX (Luminex, USA) using the kits MILLIPLEX® MAP (Merck, Germany). BDNF concentration was significantly correlated with the severity of positive symptoms in schizophrenic patients. Antipsychotics induced hyperprolactinemia is the need to monitor the level of prolactin to develop personalized approaches to treatment and improve the quality of life of patients.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, prolactin, schizophrenia, multiplex analysis, antipsychotic therapy.

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения относится к социально значимым заболеваниям человека в связи с высокой распространенностью, прогрессивностью, тяжестью социальных последствий и высоким бременем экономических затрат. Распространенность шизофрении составляет около 1%, и это заболевание является одним из наиболее губительных нейropsychических заболеваний, присущих человеческой популяции [1]. Болезнь характеризуется сочетанием продуктивной (галлюцинаторно-бредовой, аффективной и др.) и негативной (апатия, абулия, эмоциональная и социальная отгороженность и др.) симптоматики, поведенческих и когнитивных нарушений (памяти, внимания, мышления и др.) [2, 3].

Несмотря на многолетние фундаментальные исследования шизофрении, патогенез заболевания неизвестен. В настоящее время основные направления исследований имеют трансляционную направленность и связаны с поиском биомаркеров заболевания и разработкой персонализированных подходов к терапии [4, 5].

В качестве возможных периферических биомаркеров, которые перспективно использовать в качестве диагностических факторов и прогноза ответа на терапию (тераностика), предлагаются показатели, связанные с нейропротективными и нейротрофическими системами [6]. Нейротрофические факторы оказывают наиболее сильное трофическое влияние на все основные процессы жизнедеятельности нейронов.

Это регуляторные белки нервной ткани, которые синтезируются в нейронах и глии. К нейротрофическим факторам мозга относятся фактор роста нервов (NGF), нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофины и др.

BDNF, как известно, отвечает за развитие, регенерацию, сохранение и поддержание нейронов, участвует в дифференцировке нейронов, созревании, выживании и формировании синапсов. Во взрослом организме основная функция BDNF – нейропротекция.

Нейропептид пролактин, который обычно рассматривается как гормон, регулирующий физиологические реакции, связанные с репродуктивной функцией, в то же время обладает плеiotропными эффектами в отношении процессов адаптации, стресса, нейрогенеза и нейропротекции [7].

Нарушение концентрации пролактина при шизофрении может быть вызвано дофаминергическим дисбалансом, характерным для данного заболевания. Пролактин является единственным из гормонов передней доли гипофиза, который находится под тоническим ингибирующим влиянием гипоталамуса. Это ингибирующее действие обусловлено дофамином посредством стимуляции дофаминовых рецепторов, локализованных на лактотрофах. Дофамин и его агонисты стимулируют D2-рецепторы, что приводит к ингибированию аденилатциклазы с соответствующим снижением высвобождения и секреции пролактина.

Антипсихотические препараты, применяемые в терапии шизофрении, зачастую приводят к повышению уровня пролактина (гиперпролактинемии). Гиперпролактинемия осложняет течение основного заболевания, усиливая выраженность негативных и аффективных расстройств, приводит к дополнительной социальной стигматизации пациентов, ухудшает качество их жизни и является причиной отказа пациентов от проводимой терапии [8, 9].

Целью настоящего исследования явилось определение концентрации мозгового нейротрофического фактора и пролактина у больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Было проведено комплексное клиничко-биологическое обследование 115 больных шизофренией, находящихся на лечении в психиатрическом стационаре. Включение пациентов и лиц контрольной группы в исследование проводилось с учетом этических норм согласно протоколу, утвержденному локальным этическим комитетом при НИИ психического здоровья (протокол № 80 от 22 июня 2015). У всех обследуемых

лиц получено информированное согласие на проведение исследования.

Проводилась стандартизация группы по полу, возрасту, стадии и длительности заболевания, тяжести актуального состояния и коморбидной патологии. На всех пациентов заполнялся модифицированный вариант базисной карты стандартизированного описания больного шизофренией и шкала позитивных и негативных синдромов (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS).

Критериями включения в исследование являлись возраст пациентов от 18 до 65 лет; диагноз по МКБ-10: лица, имеющие верифицированный диагноз «шизофрения» [F20.0 – параноидная шизофрения, F20.5 – остаточная шизофрения (резидуальное шизофреническое состояние), F20.6 – простой тип шизофрении]; наличие подписанной формы информированного согласия на участие в исследовании.

Все пациенты в момент обследования получали антипсихотическую терапию. Назначение антипсихотических препаратов осуществлялось с учетом ведущей симптоматики, спектра психотропной активности нейролептика, а также характера возможных побочных эффектов и противопоказаний к применению. В качестве психотропной терапии пациенты получали препараты в виде монотерапии или их комбинаций: традиционные (галоперидол, хлорпромазин, хлорпроксен) и атипичные антипсихотические препараты (рисперидон, клозапин, кветиапин).

Для создания контрольной группы для лабораторных исследований было обследовано 22 психически и соматически практически здоровых лица, соответствующих по полу и возрасту обследуемой группе больных, не имеющих хронических заболеваний и не состоящих на диспансерном учете, без признаков перенесенных острых инфекционных заболеваний на момент обследования.

В качестве исследуемого материала для биохимических исследований использовалась сыворотка крови. Утром, натощак, производится взятие образца крови у пациента из локтевой вены в пробирки фирмы Vacutainer (Becton Dickinson, США) с активатором свертывания крови (инертными силиконовыми частицами – SiO₂, нанесенными на внутренние стенки пробирки). Для получения сыворотки пробирку с венозной кровью центрифугируют при 1500 об/мин в течение 20 минут. После центрифугирования полученную сыворотку забирают для исследования с помощью пипеточного дозатора индивидуальными сменными наконечниками в пластиковые пробирки типа «эппендорф» в количестве, не превышающем 40% от объема пробирки. После этого производят замораживание

сыворотки крови при разделении ее на несколько дублирующих аликвот в пробирках типа «эппендорф». Замораживание образцов сыворотки крови в морозильной камере при температуре $-18...-20^{\circ}\text{C}$ позволяет хранить образцы в течение 1–1,5 месяцев, при более низких температурах $-65...-80^{\circ}\text{C}$ срок их хранения практически не лимитируется.

Концентрация BDNF и пролактина определялась на мультиплексном анализаторе MAGPIX (Luminex, США) с использованием наборов MILLIPLEX® MAP (Merck, Германия). Конечные результаты выражали в нг/мл.



Мультиплексный анализатор MAGPIX

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета SPSS 20.0 для Windows (SPSS: An IBM Company, США). Выборки проверяли на нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка. Для независимых выборок при распределении, отличающемся от нормального, достоверность различий определяли по U-критерию Манна – Уитни с вычислением медианы и квартилей (Me [Q1; Q3]). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В исследуемой выборке пациентов преобладали мужчины (85 человек, 73,9%), женщины составили 26,1% (30 человек). В исследование включены лица от 18 до 65 лет, медиана возраста составила 38 (31, 47) лет. Средняя продолжительность заболевания (в годах) составила 10,0 (5,0 – 19,75).

Больные имели следующие баллы по шкале PANSS: балл для позитивных симптомов составил 19,0 (12,0–25,0), балл для негативных симптомов – 24,0 (18,0–30,0), балл для общих психопатологических симптомов – 45,0 (36,0–60,0), общий балл – 88,0 (68,0–112,0).

Концентрация BDNF в сыворотке крови здоровых лиц и больных шизофренией статистически не различалась (таблица 1).

Таблица 1.

Концентрация BDNF (нг/мл) в сыворотке крови здоровых лиц и больных шизофренией (Me [Q1; Q3])

	Концентрация BDNF, нг/мл	Критерий Манна-Уитни
Здоровые лица	2,2 [0,9; 3,2]	p=0,612
Больные шизофренией	2,3 [1,1; 3,7]	

В связи с физиологическими особенностями содержание пролактина в сыворотке крови женщин имеет более высокий уровень по сравнению с показателями мужчин. Поэтому при анализе результатов исследуемые выборки были разделены по полу. У больных шизофренией наблюдается достоверное повышение концентрации пролактина по сравнению со значениями здоровых лиц (таблица 2).

Таблица 2.

Концентрация пролактина (нг/мл) в сыворотке крови здоровых лиц и больных шизофренией (Me [Q1; Q3])

Группа		Концентрация пролактина, нг/мл	Критерий Манна – Уитни
Мужчины	Здоровые лица	10,0 [6,0; 13,2]	p<0,001
	Больные шизофренией	19,0* [10,3; 34,2]	
Женщины	Здоровые лица	12,3 [6,7; 16,8]	p<0,001
	Больные шизофренией	45,4* [14,9; 76,4]	

При этом у больных шизофренией женского пола наблюдается ярко выраженная гиперпролактинемия. Критерием постановки ГП у женщин является концентрация пролактина свыше 25 нг/мл, для мужчин – 20 нг/мл.

Пациенты были разделены на группы в зависимости от длительности заболевания. Содержание BDNF в сыворотке крови у больных в этих группах достоверно не отличалось (таблица 3).

Таблица 3.

Концентрация BDNF (нг/мл) в сыворотке крови больных шизофренией в зависимости от длительности заболевания (Me [Q1; Q3])

	Длительность заболевания				Критерий Краскела – Уоллиса
	Менее 3 лет	От 3 до 5 лет	От 6 до 10 лет	Более 10 лет	
BDNF, нг/мл	3,2 [1,0; 6,2]	2,4 [0,9; 4,3]	2,9 [1,7; 3,9]	2,0 [0,9; 3,2]	p=0,355

При анализе уровня пролактина было выявлено повышение концентрации пролактина у больных шизофренией с продолжительностью заболевания от 3 до 5 лет по сравнению с другими группами (таблица 4).

Таблица 4.

Концентрация пролактина (нг/мл) в сыворотке крови больных шизофренией в зависимости от длительности заболевания (Me [Q1; Q3])

	Длительность заболевания			
	Менее 3 лет	От 3 до 5 лет	От 6 до 10 лет	Более 10 лет
Мужчины	14,9 [6,6; 45,14]	32,5 [17,7; 60,26]	16,6* [10,2; 30,2]	18,2** [10,0; 31,3]
Женщины	57,4 [27,6; 93,2]	95,1 [41,3; 104,2]	25,6# [10,1; 51,8]	40,9## [14,1; 72,9]

Примечание: * – p=0,015, ** – p=0,014, # – p=0,03, ## – p=0,07 – уровень статистической значимости различий концентраций пролактина у больных шизофренией с разной длительностью заболевания по сравнению с показателем пациентов, болеющих от 3 до 5 лет.

Была определена ведущая симптоматика больных шизофренией: позитивная симптоматика зарегистрирована у 54,8% пациентов, негативная – у 37,3%, не удалось установить ведущую симптоматику у 7,9% больных. В зависимости от этого распределения была проанализирована концентрация мозгового нейротрофического фактора: у пациентов с преобладанием позитивного профиля уровень BDNF составил 2,5 (1,2; 3,8) нг/мл, при негативной симптоматике наблюдалась незначительная тенденция к снижению – 1,9 (0,7; 3,3) г/мл (p=0,19).

Аналогичная ситуация наблюдается при анализе уровня пролактина: в зависимости от ведущего профи-

ля симптоматики достоверных различий выявлено не было (таблица 5).

Таблица 5.

Концентрация пролактина (нг/мл) в группах больных шизофренией с преобладанием позитивной либо негативной симптоматики (Me [Q1; Q3])

Группа		Концентрация пролактина, нг/мл	Критерий Манна – Уитни
Мужчины	Больные шизофренией с преобладанием позитивной симптоматики	19,8 [10,5; 42,6]	p=0,822
	Больные шизофренией с преобладанием негативной симптоматики	18,7 [9,3; 30,2]	
Женщины	Больные шизофренией с преобладанием позитивной симптоматики	45,4 [18,6; 79,8]	p=0,321
	Больные шизофренией с преобладанием негативной симптоматики	27,8 [6,8; 81,4]	

Для установления факта наличия связи между концентрацией BDNF в сыворотке крови и выраженностью позитивных, негативных и общих психопатологических симптомов, оцененных по шкале PANSS, был проведен корреляционный анализ (таблица 6).

Таблица 6.

Коэффициенты корреляции Спирмена баллов по шкале позитивных и негативных синдромов и концентрации BDNF в сыворотке крови больных шизофренией

Баллы по шкале PANSS	Концентрация BDNF в сыворотке крови
Позитивная симптоматика	r=0,284 p=0,004
Негативная симптоматика	r=0,115 p=0,126
Общие психопатологические симптомы	r=-0,013 p=0,895

Была выявлена положительная корреляция (r=0,284, p=0,004) между уровнем BDNF в сыворотке крови больных шизофренией и баллом по шкале

PANSS для позитивных симптомов. В то же время не было найдено статистически значимой корреляции концентрации BDNF и балла по шкале PANSS для негативных и общих психопатологических симптомов. Как и в случае корреляционного анализа концентрации пролактина и ведущей симптоматики, достоверных результатов не выявлено (таблица 7).

Таблица 7.

Коэффициенты корреляции Спирмена баллов по шкале PANSS и концентрации пролактина в сыворотке крови больных шизофренией

Группа	Баллы по шкале PANSS	Концентрация пролактина в сыворотке крови
Мужчины	Позитивная симптоматика	$r=0,021$ $p=0,832$
	Негативная симптоматика	$r=0,097$ $p=0,316$
	Общие психопатологические симптомы	$r=-0,064$ $p=0,507$
Женщины	Позитивная симптоматика	$r=0,046$ $p=0,790$
	Негативная симптоматика	$r=-0,224$ $p=0,188$
	Общие психопатологические симптомы	$r=-0,160$ $p=0,351$

Литературные данные о содержании BDNF в сыворотке крови противоречивы. В метаанализе Green M.J. et al. [10] была показана низкая концентрация BDNF у больных шизофренией. Ряд исследований продемонстрировал высокий уровень BDNF в сыворотке крови больных шизофренией [11]. В работе T.L. Huang and C.T. Lee [12] не было найдено различий в концентрации BDNF между группами контроля и больных шизофренией. Отсутствие различий в концентрации BDNF, выявленное в нашем исследовании, может быть объяснено гетерогенностью группы по полу, возрасту и длительности заболевания, наличию соматической патологии.

В данном исследовании высокая концентрация BDNF статистически значимо коррелировала с выраженностью позитивной симптоматики у больных шизофренией. В настоящее время известно, что дофаминергическая система вовлечена в патогенез шизофрении, в частности в формирование позитивной симптоматики [13]. Между BDNF и дофаминергической системой существует тесная связь. Данный белок

обладает протективным эффектом в отношении дофаминергических нейронов и способствует их выживаемости. Дофамин, в свою очередь, способен индуцировать транскрипцию гена BDNF. Вероятно, что при формировании позитивных симптомов шизофрении наблюдается повышенный синтез BDNF за счет активации дофаминергической системы. Также, возможно, сам BDNF может усиливать позитивные симптомы, обеспечивая выживаемость дофаминергических нейронов.

Синдром гиперпролактинемии – патологическое состояние, характеризующееся наличием повышенного пролактина в сыворотке и клинической симптоматикой. В нашем исследовании было выявлено повышение концентрации пролактина больных шизофренией по сравнению с контрольной группой. Гиперпролактинемия у больных шизофренией чаще всего связана с приемом антипсихотических препаратов: так, индуцированная традиционными антипсихотическими препаратами гиперпролактинемия диагностируется в среднем, по данным литературы, у 47–50% больных [14].

У пациентов с длительностью заболевания более 3 лет выявлено существенное повышение концентрации гормона по сравнению с лицами, болеющими меньшее время. Чем дольше продолжительность заболевания, тем дольше и прием антипсихотических препаратов, что вызывает постепенное и продолжительное нарастание концентрации пролактина. При дальнейших метаболических нарушениях происходит компенсаторная реакция организма антагонистического действия, приводящая к постепенному снижению уровня гормона.

Наиболее часто уровень пролактина повышается у женщин репродуктивного возраста (65%) и постменопаузальном периоде (45%), а у мужчин – в 42% случаев. Эти показатели могут быть занижены, так как в большинстве случаев гиперпролактинемия регистрируется по обращаемости при появлении симптомов, а клиническая симптоматика нередко отсутствует. В одном из скрининговых исследований у 194 пациентов, получавших нейролептики, уровень пролактина определяли независимо от наличия клинических проявлений, при этом частота ГП составила 38%. В ретроспективных исследованиях встречаются данные о распространенности ГП у 68% больных [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поиск биомаркеров, которые могут быть использованы в диагностике, оценке ведущей симптоматики, предикции ответа на терапию и развитие побочных эффектов у больных шизофренией является

важным шагом по направлению к разработке персонализированной терапии. Большинство биологических исследований при шизофрении проведены на тканях мозга и в настоящий момент не транслированы в конкретные биомаркеры для практического использования в связи с недоступностью биопсии мозга; современные техники нейровизуализации являются дорогостоящими, и результаты, полученные с их применением, представляются неоднозначными. В связи с этим определение периферических биомаркеров («blood-based biomarkers») при шизофрении с использованием мультиплексного анализа, позволяющего одновременно в пробах определять несколько субстанций, является реально существующей альтернативой. Полученные в нашем исследовании результаты демонстрируют необходимость проведения определения концентрации пролактина у больных шизофренией, длительно получающих антипсихотическую терапию, для своевременной диагностики гиперпролактинемии, как побочного эффекта фармакотерапии, и изменения терапевтической тактики ведения пациентов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 14-15-00480 «Поиск ключевых биомаркеров патогенеза социально значимых эндогенных психических расстройств».

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Tandon, M. S. Keshavan, H. A. Nasrallah. Schizophrenia, «just the facts» what we know in 2008. 2. Epidemiology and etiology // Schizophr. Res. 2008. V. 102 (1–3). P. 1–18.
2. А.С. Тиганов, А.В. Снежневский, Д.Д. Орловская и др. Руководство по психиатрии. В 2 томах. Т. 1 / Под ред. А.С. Тиганова. — М.: Медицина, 1999. 712 с.
3. А.В. Семке, Т.П. Ветлугина, Л.Д. Рахмазова, С.А. Иванова, Е.Д. Счастный, О.Ю. Федоренко, О.А. Лобачева, Е.В. Гуткевич, Е.Г. Корнетова, О.А. Даниленко. Биологические и клиничко-социальные механизмы развития шизофрении (итоги комплексной темы НИР ФГБУ «НИИПЗ» СО РАМН, 2009–2012 гг.) // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2013. № 4 (79). С. 18–26.
4. С.А. Иванова, О.Ю. Федоренко, Л.П. Смирнова, А.В. Семке. Поиск биомаркеров и разработка фармакогенетических подходов к персонализированной терапии больных шизофренией // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2013. № 1. С. 12–16.
5. М.Г. Узбеков, И.Я. Гурович, С.А. Иванова. Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода // Социальная и клиническая психиатрия. 2016. Т. 26. Вып. 1. С. 5–11.
6. C.Y. Lai, E. Scarr, M. Udawela, I. Everall, W. J. Chen, B. Deani. Biomarkers in schizophrenia: A focus on blood based diagnostics and theranostics // World J Psychiatry. 2016. № 6(1). P. 102–17.
7. L. Torner. Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology // Front. Endocrinol. 2016. 7:25.
8. Л.Н. Горобец Нейроэндокринные дисфункции и нейролептическая терапия. – М.: Медпрактика-М, 2007.
9. Е. Г. Корнетова, С.А. Иванова, А.В. Семке, Ю.Н. Бородюк, А.С. Бойко. Гиперпролактинемия как побочный эффект антипсихотической терапии больных шизофренией // Пособие для врачей. – Томск, 2015. 28 с.
10. M.J. Green, S.L. Matheson, A. Shepherd, C.S. Weickert, V.J. Carr. Brain-derived neurotrophic factor levels in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis // Mol Psychiatry. 2011. V. 16. № 9. P. 960–972.
11. H. J. Reis, R. Nicolato, I.G. Barbosa, P.H. Teixeira do Prado, M.A. Romano-Silva, A. L. Teixeira. Increased serum levels of brain-derived neurotrophic factor in chronic institutionalized patients with schizophrenia // Neurosci Lett. 2008. V. 439. № 2. P.157–159.
12. T.L. Huang, C.T. Lee. Associations between serum brain-derived neurotrophic factor levels and clinical phenotypes in schizophrenia patients // Journal of Psychiatry Research. 2006. V. 40. № 7. P. 664–668.
13. J.M. Stone, P.D. Morrison, L.S. Pilowsky. Glutamate and dopamine dysregulation in schizophrenia—a synthesis and selective review // J Psychopharmacol. 2007. V. 21. № 4. P. 440–452.
14. О.А. Юнилайнен, Е.Г. Старостина, Л.К. Дзеранова, Г.С. Колесникова, Н.П. Гончаров, Э.Г. Рытик, Г.Н. Кудряшкина, Е.Н. Тулинцева, Л. Г. Кессельман, П.А. Баранов, И.И. Дедов. Эпидемиологические характеристики гиперпролактинемии, ассоциированной с приемом нейролептиков // Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2014. № 4. С. 12–23.
15. J. Montgomery, E. Winterbottom, M. Jessani, E. Kohegyi, J. Fulmer, B. Seamonds, R.C. Josiassen. Prevalence of hyperprolactinemia in schizophrenia: association with typical and atypical antipsychotic treatment // J. Clin. Psychiatry. 2004. V. 65. № 11. P. 1491–1498.