

Применение метода масс-спектрометрической визуализации двух областей неокортекса для выявления гистологической селективности липидных изменений, характерных для шизофрении

Mass spectrometry imaging of two neocortical areas reveals the histological selectivity of schizophrenia-associated lipid alterations

doi: 10.17816/CP15488

Оригинальное исследование

Maria Osetrova¹, Marina Zavolskova¹, Pavel Mazin², Elena Stekolschikova¹, Gleb Vladimirov¹, Olga Efimova¹, Anna Morozova^{3,4}, Yana Zorkina^{3,4}, Denis Andreyuk³, George Kostyuk³, Evgeniy Nikolaev¹, Philipp Khaitovich¹

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

² Wellcome Sanger Institute, Hinxton, UK

³ Mental-health clinic No. 1 named after N.A. Alexeev, Moscow, Russia

⁴ V. Serbsky National Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Мария Осетрова¹, Марина Завольскова¹, Павел Мазин², Елена Стекольщикова¹, Глеб Владимиров¹, Ольга Ефимова¹, Анна Морозова^{3,4}, Яна Зоркина^{3,4}, Денис Андреюк³, Георгий Костюк³, Евгений Николаев¹, Филипп Хайтович¹

¹ АНОО ВО «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

² Институт Сенгера, Хинкстон, Великобритания

³ ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

⁴ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия

ABSTRACT

BACKGROUND: Schizophrenia is a psychiatric disorder known to affect brain structure and functionality. Structural changes in the brain at the level of gross anatomical structures have been fairly well studied, while microstructural changes, especially those associated with changes in the molecular composition of the brain, are still being investigated. Of special interest are lipids and metabolites, for which some previous studies have shown association with schizophrenia.

AIM: To utilize a spatially resolved analysis of the brain lipidome composition to investigate the degree and nature of schizophrenia-associated lipidome alterations in the gray and white matter structures of two neocortical regions — the dorsolateral prefrontal cortex (Brodmann area 9, BA9) and the posterior part of the superior temporal gyrus (Brodmann area 22, posterior part, BA22p), as well compare the distribution of the changes between the two regions and tissue types.

METHODS: We employed Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Imaging (MALDI-MSI), supplemented by a statistical analysis, to examine the lipid composition of brain sections. A total of 24 neocortical sections from schizophrenia patients ($n=2$) and a healthy control group ($n=2$), representing the two aforementioned neocortical areas, were studied, yielding data for 131 lipid compounds measured across more than a million MALDI-MSI pixels.

RESULTS: Our findings revealed an uneven distribution of schizophrenia-related lipid alterations across the two neocortical regions. The BA22p showed double the differences in its subcortical white matter structures compared to BA9, while less bias was detected in the gray matter layers. While the schizophrenia-associated lipid differences generally showed good agreement between brain regions at the lipid class level for both gray and white matter, there were consistently more discrepancies for white matter structures.

CONCLUSION: Our study found a consistent yet differential association of schizophrenia with the brain lipidome composition of distinct neocortical areas, particularly subcortical white matter. These findings highlight the need for broader brain coverage in future schizophrenia research and underscore the potential of spatially resolved molecular analysis methods in identifying structure-specific effects.

АННОТАЦИЯ

ВВЕДЕНИЕ: Шизофрения — это психическое расстройство, известное своим влиянием на структуру и функциональность мозга. Хотя изменения в архитектуре мозга на уровне крупных анатомических структур были исследованы достаточно подробно, микроструктурные изменения, особенно связанные с молекулярным составом мозга, остаются предметом интенсивного изучения. В последние годы особое внимание уделяется липидам и метаболитам, поскольку ряд предыдущих работ выявил их возможную связь с шизофренией. Понимание этих молекулярных изменений может помочь в раскрытии механизмов, лежащих в основе этого расстройства, и в разработке новых подходов к его диагностике и лечению.

ЦЕЛЬ: Исследовать степень и характер ассоциированных с шизофренией различий в пространственном распределении липидов в сером и белом веществе двух областей неокортекса — в дорсолатеральной префронтальной коре (поле Бродмана 9, BA9) и задней части верхней височной извилины (поле Бродмана 22, задняя часть, BA22p), а также сравнить распределение различий между двумя областями и типами тканей.

МЕТОДЫ: Проведена визуализация при помощи метода масс-спектрометрии с применением матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-MSI). Всего было исследовано 24 среза, полученных от больных шизофренией ($n=2$) и от здорового контроля ($n=2$), представляющих две вышеупомянутых области неокортекса, что позволило проанализировать данные по 131 липидному соединению, измеренному по более чем миллиону пикселей MALDI-MSI.

РЕЗУЛЬТАТЫ: Обнаружено неоднородное распределение разницы в уровне липидов, связанных с шизофренией, в двух исследованных областях неокортекса. Белое вещество из BA22p показало больше различий по сравнению с белым веществом из BA9, в то время как в сером веществе дисбаланс количества различий менее выражен. Хотя изменения липидов, связанные с шизофренией, в целом, хорошо согласуются между областями мозга на уровне классов липидов как для серого, так и для белого вещества, было обнаружено значительно больше расхождений для структур белого вещества.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Исследование выявило согласованную, но дифференцированную связь между шизофренией и составом липидома мозга в различных областях неокортекса, особенно в подкорковом белом веществе. Полученные результаты подчеркивают важность учета специфики мозговых структур в будущих исследованиях шизофрении и демонстрируют перспективность методов молекулярного анализа с пространственным разрешением для выявления структурно-ориентированных изменений, связанных с этим расстройством.

Keywords: *schizophrenia; lipidomics; mass-spectrometry; MALDI-MSI; neocortex*

Ключевые слова: *шизофрения; липидом; масс-спектрометрия; MALDI-MSI; неокортекс*

ВВЕДЕНИЕ

Шизофрения является психическим расстройством, распространенность которого в мировой популяции составляет от 0,3 до 0,45 %¹ [1, 2], достигая в некоторых странах 4,7 % [3, 4], что значительно влияет на социальную сферу и здравоохранение [2]. Молекулярные основы шизофрении остаются недостаточно изученными ввиду многофакторности природы заболевания и гетерогенности тканей головного мозга. Недавние достижения в сфере молекулярной визуализации с высоким разрешением, например визуализационная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MSI), предоставляют беспрецедентные возможности для прояснения пространственного распределения молекул в срезах тканей [5–7], формируя более полное понимание биохимических изменений, ассоциированных с шизофренией [8]. Метод MALDI-MSI, используемый для изучения молекулярных изменений, свойственных другим нарушениям, эффективно выявляет и лоцирует потенциальные биомаркеры [9], позволяя глубже понять этиологию заболевания [10, 11].

Преыдушие исследования тканей головного мозга пациентов с шизофренией с помощью масс-спектрометрии выявили детектируемые метаболические изменения, затрагивающие, в частности, гидрофобные метаболиты, известные как липиды [12–14]. Аналогичным образом генетические исследования выявили у пациентов с шизофренией ассоциации, связанные с генами, отвечающими за метаболизм липидов [15, 16]. Несмотря на увеличение количества исследований, посвященных метаболиту и, в частности, липидому головного мозга при шизофрении, всестороннее понимание метаболических изменений, связанных с этим инвалидирующим заболеванием, пока не достигнуто. Одной из причин отсутствия системного понимания является почти исключительная сосредоточенность большинства молекулярных исследований на определенной зоне головного мозга — дорсолатеральной префронтальной коре.

Отсутствие пространственного разрешения у большинства методов, используемых для молекулярного исследования тканей, также препятствует полному раскрытию изменений, связанных с шизофренией. В традиционных исследованиях липидома образцы

для жидкостной или газовой хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией нередко готовят путем гомогенизации биологических материалов, что часто приводит к утере информации о пространственном распределении липидов. При этом кора головного мозга обладает сложной многослойной структурой, которая влияет на ее функционирование [17, 18]. Более того, показано, что определенные липиды и классы липидов различным образом распределены в слоях коры головного мозга [19]. В совокупности эти моменты подчеркивают необходимость использования ранее не применявшихся методов исследования с пространственным разрешением для изучения молекулярного состава разных областей головного мозга при шизофрении.

Дорсолатеральная префронтальная кора, которая находилась в центре внимания многочисленных исследований шизофрении, имеет отношение к таким негативным симптомам, как нарушение когнитивного контроля [20], дисфункция оперативной памяти [21] и ангедония [22–24]. Исследование пространственного липидома префронтальной коры головного мозга при шизофрении выявило некоторые нарушения метаболизма фосфолипидов, но предоставило лишь ограниченную информацию о других классах липидов. В нем также отсутствовали статистические оценки [8]. Изменения в объеме левой верхней височной извилины систематически ассоциировались со слуховыми галлюцинациями — основным позитивным симптомом шизофрении [25]. Кроме того, исследования экспрессии генов, в ходе которых изучали различные области неокортекса, показали наибольшее количество изменений экспрессии генов в этой зоне [26–28]. Однако ни одно из предыдущих исследований не было сфокусировано на пространственном распределении липидов в этой височной области. Более того, не проведен сравнительный анализ по двум областям.

Целью настоящего исследования было применение пространственно-разрешенного анализа состава липидома головного мозга для изучения степени и характера ассоциированных с шизофренией изменений липидома в структуре серого и белого вещества [27–29] двух неокортикальных областей — дорсолатеральной префронтальной коры (поле Бродмана 9, BA9) и задней части верхней височной извилины (поле Бродмана 22,

¹ Информация доступна по ссылке: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>

задняя часть, BA22p). Акцент на этих двух областях позволил, используя выбранный авторами метод, сформировать систему координат для оценки полученных результатов в виде хорошо изученной области BA9, а также предоставил возможность сбора совершенно новых данных по области, которая ранее не изучалась. В дальнейшем были обследованы два гистологических участка в каждой области: один, относящийся к субкортикальному слою белого вещества, и второй, относящийся к неокортикальному слою серого вещества.

МЕТОДЫ

Образцы тканей

Образцы тканей головного мозга здоровых контрольных лиц (ЗКЛ) и пациентов с шизофренией (ПШ) (пол: М/Ж = 0/2 и 1/1; возраст: 36, 63 и 62, 56 соответственно) были получены из биологических материалов, предоставленных Контрактной исследовательской организацией «Национальный БиоСервис» (Санкт-Петербург, Россия). Ни у одного из участников контрольной группы в анамнезе не было психических или нейродегенеративных заболеваний, а при патологоанатомическом обследовании не обнаружено грубых анатомических аномалий. Шизофрения у доноров головного мозга была диагностирована психиатрами в соответствии с МКБ-10 во время стационарного лечения в Психиатрической клинической больнице № 1 им. Н.А. Алексеева (Москва, Россия). Все участники скончались скоропостижно без продолжительной агонии.

Полученные срезы постмортального головного мозга были помещены на алюминиевые блоки и заморожены на сухом льду. Все образцы транспортировали на сухом льду и длительно хранили в морозильных камерах при температуре -80°C . Размораживания или нагревания образцов в какой-либо момент времени не зарегистрировано. Две исследуемые области (BA9 и BA22p) были локализованы специалистом по нейроанатомии в соответствии с Атласом головного мозга человека². Всего проанализировано 24 образца. Они охватили две области у двух лиц из обеих групп (ЗКЛ и ПШ) и оценивались в трех повторностях, что означает, что каждая область каждого участника была представлена тремя препаратами ткани головного мозга (табл. S1 в дополнительных файлах).

² Информация доступна по ссылке: <https://atlas.brain-map.org/atlas?atlas=265297126#atlas=26529712102339958&structure=10179&x=30131.805555555555&y=37587.999131944445&zoom=-7&resolution=138.6&plate=71&z=3>

Патологоанатомические препараты

Срезы образцов головного мозга изготавливали при помощи микротомы-криостата Leica CM1950 (Leica Biosystems, Китай). Срезы получали при температуре камеры -18°C ; температура образцов составляла -15°C . Толщину срезов устанавливали на 20 мкм. Срезы помещали на предметное стекло с покрытием из оксида индия-олова (ITO) без адгезивной среды (Hudson Surface Technology, предметные стекла для MALDI-визуализации, Республика Корея) и фиксировали на нем за счет размораживания. Затем срезы помещали в осушитель на 90 минут. Воздух из камеры удаляли при помощи мембранного насоса MEMVAK 2x1 под давлением 30 мбар при комнатной температуре. Раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты (Sigma-Aldrich, США) концентрацией 5 мг/мл в смеси вода/ацетонитрил 50/50 с 0,1 % раствором трифторуксусной кислоты (TFA, Sigma-Aldrich, США) разбавляли дважды. Внутренние стандарты не добавляли. Разбавленный раствор распыляли при помощи аэрографа Iwata Micron CM-B2 (Anest Iwata, Япония) в течение 2 секунд и позволяли высохнуть 2,5 минуты. Этот процесс повторяли двадцать раз.

Эксперимент с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией

MALDI-изображения получали с использованием масс-спектрометра для MALDI с орбитальной ионной ловушкой (Thermo Scientific Q-Exactive Orbitrap с инжекторной приставкой MALDI/ESI от Spectrograph, LLC, США), оборудованного лазером Garnet 355 нм Nd:YAG (ООО «Лазер-экспорт», Россия). Для индукции положительных ионов мощность лазера устанавливали на 20 Дж с частотой повторения до 1,7 кГц. Дистанция между образцом на координатном столике и ионной воронкой составляла 0,5 см. Продуцируемые ионы захватывались ионной воронкой и перемещались в масс-спектрометр Q-Exactive Orbitrap (Thermo). Полученные масс-спектры находились в диапазоне масс m/z 500–1000 с разрешением 140 000. Фрагментацию не проводили. Шаблон сканирования — слева направо. MALDI-интерфейс обеспечивался в MALDI-режиме с частотой повторения лазера 1 кГц. Время накопления ионов на пиксель составляло 250 мс. Область ткани, подлежащая

визуализации, и размер шага растра контролировались с помощью программного обеспечения Spectrograph MALDI Injector. Супердискретизацию не проводили. Для генерирования изображений спектры получали с интервалами 40 мкм в направлении осей x и y по всей поверхности образца. Ионные изображения генерировали из необработанных фалов (полученных при помощи программного обеспечения Orbitrap tune) и файлов координат (полученных при помощи программного обеспечения MALDI Injector) посредством программного обеспечения Image Insight от Spectrograph LLC. Необработанные масс-спектры MALDI конвертировали в *.ibd и *.imzML форматы при помощи программного обеспечения Spectrograph с установленным на нуле порогом фонового шума. Всю дальнейшую обработку проводили с использованием пакета ПО R Cardinal 2.8.0 (Kylie A. Bemis, США), разработанного для анализа данных масс-спектрометрических изображений [30].

В целях анализа изображений из конвертированных файлов были удалены продублированные координаты. Интенсивность пика оценивали по высоте, затем спектры нормализовали по суммарному ионному току. Чтобы выбрать центры пиков для последующего анализа, пики выделяли, основываясь на пороговом значении отношения сигнал/шум равном трем. Отношение сигнал/шум рассчитывали на основе разницы между средней высотой пика в окне заданного размера и средней высотой в окне выбранной вручную плоской части спектра [31]. После выполнения процедуры выделения пиков спектры каждого пикселя выравнивали по среднему спектру всего изображения в соответствии с функциональностью библиотеки Cardinal 2.8.0 (Kylie A. Bemis, США). Пики, присутствовавшие менее чем в 7% спектров образцов, исключали из дальнейшего анализа. Изображения генерировали таким образом, чтобы пики, представляющие интерес, были сосредоточены вокруг измеренных значений m/z .

Из спектральных данных каждого образца удаляли пики, исходящие от поверхности предметного стекла, не покрытой тканью образца, и неинформативные участки спектров, не содержащие биологически значимых пиков. Для этого зона изображения образца была разделена на две части с использованием алгоритма пространственной кластеризации

по k -средним; один из кластеров соответствовал образцу ткани, а другой — свободной от образца поверхности предметного стекла, покрытой матрицей. Картирование кластеров на образцы и окружающую зону проводили вручную путем визуальной оценки предметных стекол. Для двух кластеров рассчитывали средние значения интенсивности — сохраняли только пики, средняя интенсивность которых в пределах выборочного кластера была в 1,5 раза больше, чем в окружающей зоне, свободной от образца. После этих этапов фильтрации все спектры образцов были выровнены по спектру с наибольшим количеством обнаруженных пиков.

С целью группирования пикселей в пределах зоны образца в кластеры белого и серого вещества использовали гистологическое окрашивание прилегающих срезов. Неконтролируемую кластеризацию серого вещества (без предварительного выделения пиков) выполняли с помощью функции `spatialShrunkenCentroids()` из библиотеки Cardinal. Использовали следующие параметры: $s=1$, $k=3$, $r=1$, где s — это параметры разреженности, k — количество кластеров, а r — радиус сглаживания.

Аннотация пиков

Пики были аннотированы как виды липидов по их отношению массы к заряду, при этом пороговое значение разницы в массе между исследуемыми и целевыми значениями было установлено на уровне 20 ppm. В случаях множественных совпадений применяли следующие правила (также см. рис. S1 в дополнительных файлах).

Один пик — один липид — один аддукт. При обнаружении уникального совпадения между аннотацией липида в виде конкретного аддукта и соотношением m/z MALDI-пика эта аннотация присваивалась MALDI-пику.

Несколько пиков — один липид — разные аддукты. Если на MALDI-спектре обнаруживали пики с массами, соответствующими одному и тому же липиду, но в виде разных аддуктов, приоритет отдавали аннотации липида в виде аддукта с ионом водорода. Если аддукт с ионом водорода отсутствовал, то аддукт с ионом натрия имел приоритет выше, чем аддукт с ионом калия.

Один пик — несколько липидов — разные аддукты. Если один MALDI-пик соответствовал аннотации двух

разных липидов, один из которых представлял собой водородный аддукт, а другой — любой другой аддукт, этому пику присваивали аннотацию липида в виде аддукта с ионом водорода.

Один пик — несколько липидов — один аддукт. Если один MALDI-пик соответствовал аннотации двух разных липидов, оба из которых представляли собой аддукт с ионом водорода, этому пику присваивали аннотацию обоих липидов.

Остальные липиды соответствовали классам липидов, характерным для данной ткани и матрицы³ [32–35].

Гистологическое исследование срезов

Гистологические признаки белого и серого вещества на срезах головного мозга выявляли с помощью окрашивания люксолом быстрым синим (синий краситель для богатых липидами компартментов) и эозином (розовый краситель для богатой белками цитоплазмы). Срезы головного мозга кратковременно обезжиривали для улучшения проникновения красителя: их поэтапно помещали в этанол (50%, 75%, 95% и 100%) и затем снова в 95%, выдерживая минуту в каждом растворе. Затем срезы выдерживали в 0,1%-ном растворе люксолом прочного синего (BioOptica, Италия) в этаноле с 0,5%-ным раствором ледяной уксусной кислоты в сушильном шкафу при температуре 56 °C в течение 12–14 часов. Излишки краски смывали 95% этанолом, а затем дистиллированной водой. Окрашенный препарат дифференцировали в 0,05%-ном растворе лития карбоната (BioOptica, Италия) в воде в течение 30 секунд и несколько раз промывали дистиллированной водой, постоянно контролируя с помощью микроскопии, оставалось ли серое вещество прозрачным, а белое вещество — четко очерченным. Затем срезы контрастировали 1%-ным раствором эозина (BioVitrum, Россия) в воде в течение 30–40 секунд, промывали дистиллированной водой, кратковременно обезвоживали в дегидратирующем растворе IsoPrep (BioVitrum, Россия), очищали в растворе Bio Clear (Bio-Optica, Италия) и закрывали с помощью синтетической среды Bio Mount HM (Bio-Optica, Италия). Гистологические изображения получали при помощи системы микроскопа для исследования в проходящем свете Zeiss Axio.Observer.Z1 (ZEISS, Германия).

Статистический анализ

Перед выполнением статистических тестов данных MALDI-MSI было сгенерировано изображение с липидами, пересекающееся с работой González и соавт. [19], в которой интенсивность для обоих липидов (PC 40:6 и SM d42:2) была нормализована в диапазоне от 0 до 1. Для изучения разницы в содержании липида PC 40:6 между образцами пациентов с заболеванием и контрольными образцами в каждом из полученных слоев серого вещества обеих исследуемых областей, интенсивности были нормализованы в пределах слоев для каждой области по логарифмической шкале с основанием два, после чего был проведен дисперсионный анализ (ANOVA) между слоями для каждой области и заболевания.

Все статистические тесты были выполнены на основе измеренных интенсивностей, преобразованных логарифмически по основанию два. Средние значения вычисляли для кластеров серого и белого вещества на каждом предметном стекле. Для дальнейшего анализа измеренные интенсивности от трех повторностей образцов всех лиц в каждой группе усредняли. Разницу (для значений, преобразованных логарифмически по основанию два) между образцами группы пациентов с шизофренией и образцами контрольной группы рассчитывали для каждого вида липидов в каждой области (BA9 и BA22p) и каждого гистологического кластера (серое вещество и белое вещество). Группы липидов с изменениями между двумя группами определяли как группы с абсолютными изменениями 0,25 и более на логарифмической шкале. Для оценки статистической значимости разницы в количестве липидных изменений использовали односторонний двухвыборочный t-критерий. Коэффициенты корреляции Пирсона рассчитывали по изменениям, усредненным в пределах липидных классов. Для сравнения коэффициента корреляции между группами к коэффициентам корреляции Пирсона применяли преобразование Фишера с последующим использованием одностороннего двухвыборочного Z-критерия. Анализ выполняли с использованием языка программирования R и его общедоступных библиотек [36]. Результаты анализа визуализировали при помощи пакета ggplot2().

³ Информация доступна по ссылке: <https://github.com/kuwisdelu/Cardinal/blob/devel/R/process2-peakPick.R>

Одобрение этического комитета

Заседание этического комитета не проводилось. Предоставленные данные по образцам головного мозга, полученным от организации «Национальный БиоСервис», не содержали никакой личной информации или какой-либо другой информации, которая могла бы позволить идентифицировать доноров. Формы информированного согласия на использование биоматериала в исследовательских целях были получены у отдельных лиц или у близких родственников в соответствующих клинических организациях, которые предоставили образцы организации «Национальный БиоСервис» согласно международным правилам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Настоящий анализ масс-спектрометрических профилей полей ВА9 и ВА22р, полученных из более чем миллиона пикселей 24 изображений срезов тканей, позволил сгенерировать данные по интенсивности, охватывающие 153 численные аннотации для 131 детектированных MALDI-пиков, которые представляли 16 классов липидов (табл. S2 в дополнительных файлах). Кластерный анализ этих данных на основании интенсивностей пиков липидов продемонстрировал воспроизводимое разделение неокортикальных срезов на две основные зоны, которые соответствовали гистологическим областям серого и белого вещества (кластеры GM и WM; рис. 1А, 1В). Изображения, сгенерированные

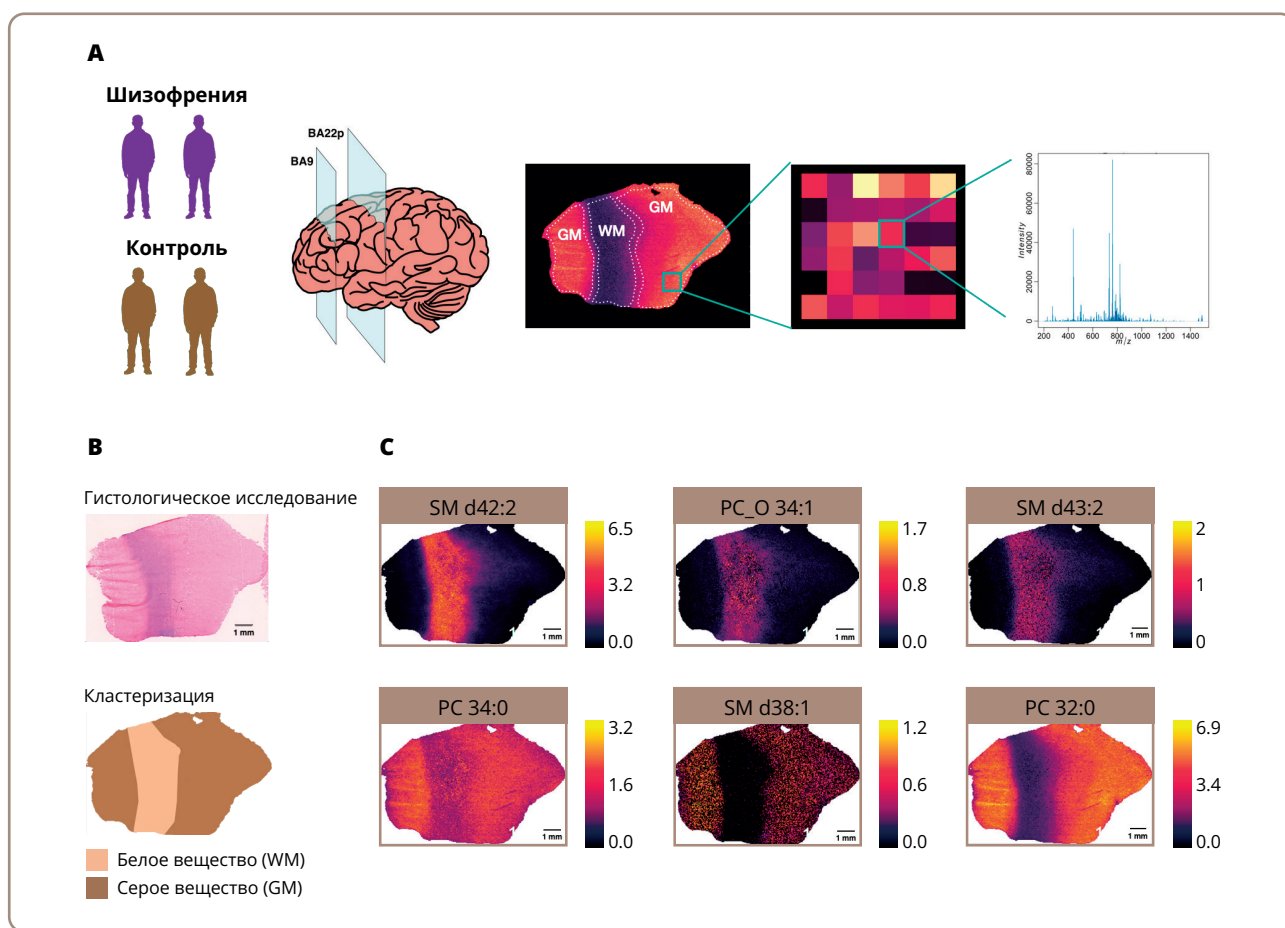


Рисунок 1. Применение метода MALDI-MSI для анализа липидов областей головного мозга.

Примечание: (А) Схематическое представление анализа образцов. Слева направо: выборка для получения образцов, выполнение тонких срезов двух областей головного мозга (поля ВА9 и ВА22р) и пространственное распределение уровней интенсивности отдельных масс-спектрометрических пиков, отвечающих за специфический молекулярный ион, определяемый на масс-спектрограмме, которую получают для каждого пикселя среза ткани. (В) Гистологическое окрашивание и кластеризация сигналов MALDI-MSI для пикселей одного из 24 исследованных срезов неокортекса. (С) Примеры липидов, демонстрирующих очевидные различия в распределении интенсивности между зонами серого и белого вещества неокортикальной области. ВА9 — поле Бродмана 9; ВА22р — поле Бродмана 22 задняя часть; SM — сфингомиелин; и PC — фосфатидилхолин.

Источники: Осетрова и соавт., 2024.

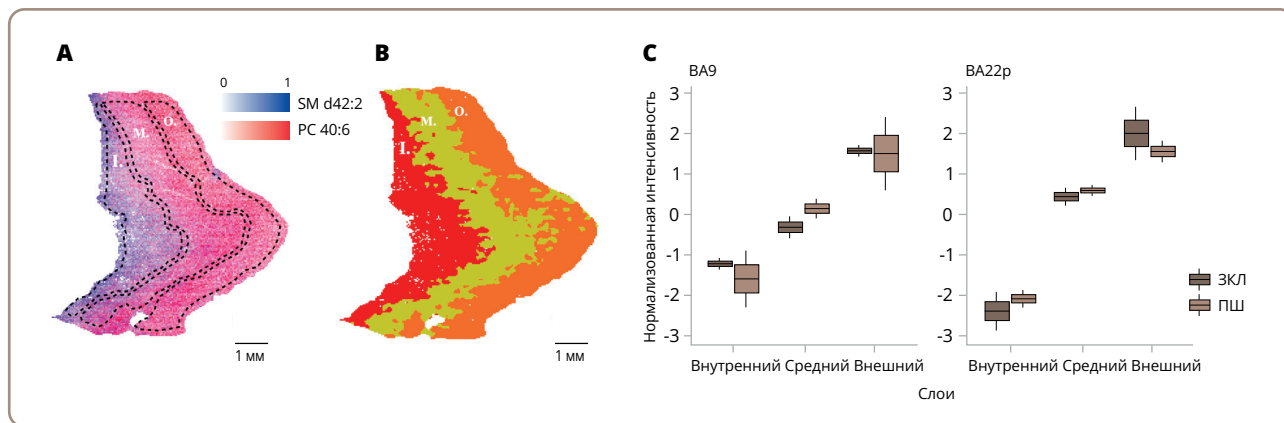


Рисунок 2. Изучение микроструктуры серого вещества.

Примечание: (А) Наложение распределения интенсивности SM d42:2 и PC 40:6 по серому веществу (I — внутренний слой, М — средний слой, О — наружный слой). (В) Неконтролируемая кластеризация данных образцов серого вещества на основании данных всех пиков. (С) Распределение кластеров средних значений всех доноров для PC 40:6 [Н+] в зонах ВА9 и ВА22. Цвет указывает на болезнь. Информация представлена в виде диаграммы типа «ящик с усами», где «ящик» представляет собой межквартильный диапазон (МКД), а внутри отмечена медиана. Усы распространяются до минимального и максимального значений.

ВА9 — поле Бродмана 9; ВА22р — поле Бродмана 22 задняя часть; ЗКЛ — здоровые контрольные лица; и ПШ — пациенты с шизофренией.
Источник: Осетрова и соавт., 2024.

по определенным липидам, иллюстрируют различия в их распределении в разных областях (рис. 1С).

В исследовании первичной зрительной коры [19] были описаны различия липидного профиля между слоями в двух соседних областях, в основном соответствующие известной вариабельности архитектоники кортикального слоя. Визуализация пространственного распределения двух гистологически ассоциированных липидов из вышеупомянутой статьи (SM d42:2, PC 40:6) в кортикальных срезах из настоящего исследования действительно выявила специфические градиенты интенсивности (рис. 2А). Проведение неконтролируемой кластеризации данных образцов серого вещества позволило сегментировать кору головного мозга на три слоя (рис. 2В). Однофакторный дисперсионный анализ выявил значимое различие средних значений содержания липида PC 40:6 в полученных слоях в группе ЗКЛ в обеих зонах ВА9 (значение $p=0,004$) и ВА22 (значение $p=0,02$), а также в группе ПШ в зоне ВА22 (значение $p=0,002$), но не в зоне ВА9 (значение $p=0,1$). Количество наблюдений в каждом сравнении — 4 на группу.

Анализ различий в интенсивности соединений между срезами групп ПШ и ЗКЛ, проведенный с использованием 131 аннотированного MALDI-пика, выявил в два раза больше различий, ассоциированных с шизофренией, в белом веществе зоны ВА22р

по сравнению с зоной ВА9: 31 и 17 различий интенсивности липидов соответственно (односторонний t-критерий, $p=0,019$) (рис. 3). Однако это несоответствие не было статистически значимым в случае серого вещества, в котором выявили 27 и 21 различие интенсивности липидов соответственно (односторонний t-критерий, $p=0,212$) (рис. 3).

Чтобы напрямую сравнить различия интенсивности липидов, связанные с шизофренией, между двумя исследуемыми областями неокортекса, были вычислены и сопоставлены средние значения кратности изменений для каждого из 16 классов липидов в каждом гистологическом кластере. Различия, связанные с шизофренией, характеризовались значимой положительной корреляцией между зонами ВА22 и ВА9 как в сером, так и в белом веществе (рис. 4). Как и следовало ожидать на основании большего расхождения числа липидов, измененных вследствие шизофрении, между белым веществом двух областей головного мозга, показанного на рис. 3, корреляция различий, связанных с шизофренией, между зонами ВА22р и ВА9 в белом веществе (корреляция Пирсона, $r=0,57$, $p=0,017$), по сравнению с серым веществом (корреляция Пирсона, $r=0,87$, $p=0,00001$) также была значимо меньше (односторонний двухвыборочный Z-критерий Фишера, преобразованный из коэффициента корреляции Пирсона, $p=0,040$).

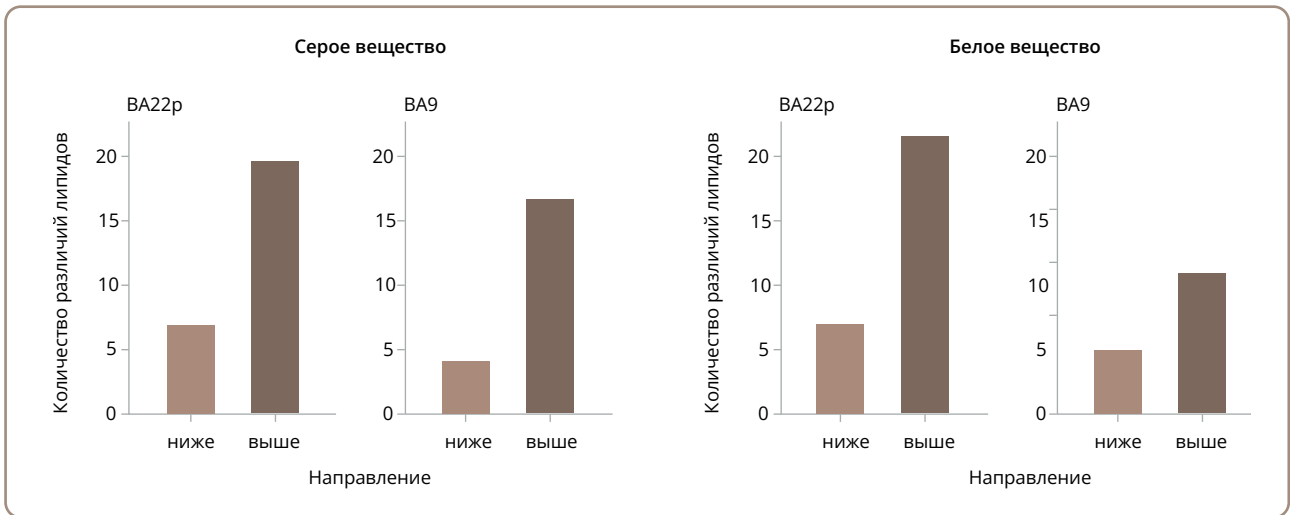


Рисунок 3. Распределение различий липидов между группами лиц с шизофренией и здоровых лиц в двух определенных областях головного мозга.

Примечание: Ящичковые диаграммы показывают количество видов липидов, которые превысили пороговые значения кратности изменений $-0,25$ и $0,25$ в сером веществе (GM — показано на левой панели) и белом веществе (WM — показано на правой панели) в интересных областях (BA9 и BA22p). Липиды с диапазоном кратности изменений распределения в пределах от $-0,25$ до $0,25$ не включены в график. *Источник:* Осетрова и соавт., 2024.

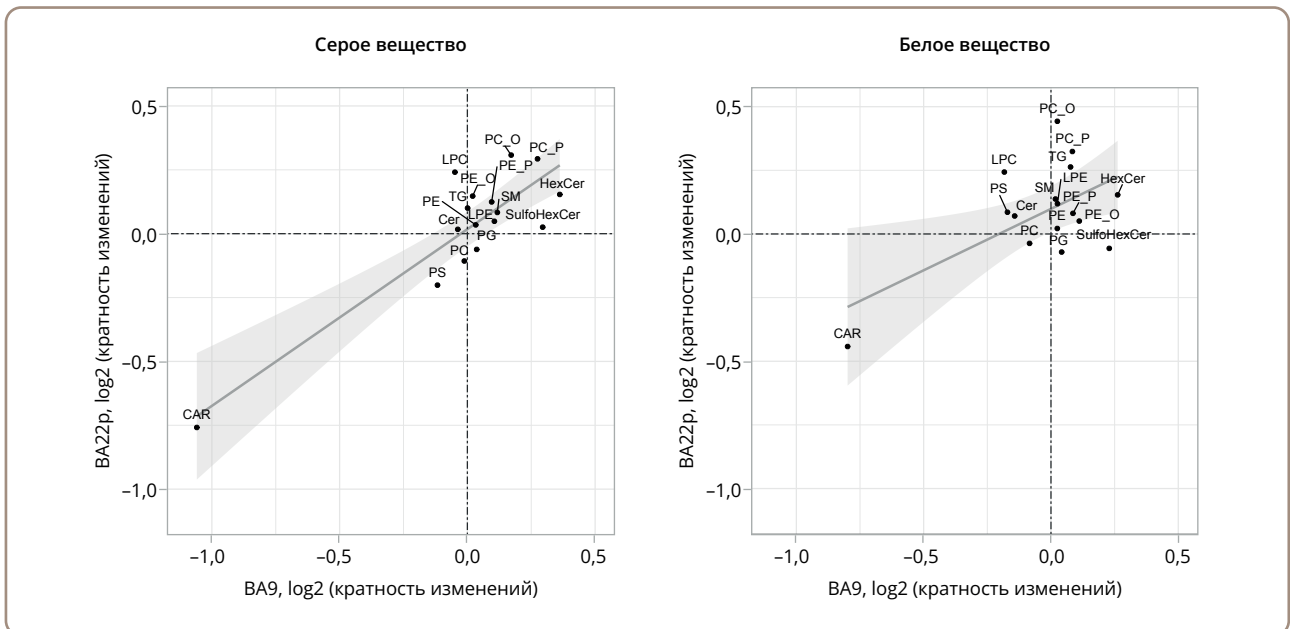


Рисунок 4. Сравнение различий, связанных с шизофренией, детектируемых в сером или белом веществе двух исследуемых областей головного мозга.

Примечание: Каждая точка обозначает среднюю разницу (кратность изменений) уровней интенсивности липидов между образцами пациентов с шизофренией и контрольными образцами, рассчитанную для всех липидов определенного класса в срезах зоны BA9 (ось x) или BA22p (ось y). Линии линейной регрессии отображали с 95%-ными доверительными интервалами, представленными заштрихованными зонами серого цвета.

BA9 — поле Бродмана 9; BA22p — поле Бродмана 22 задняя часть; SM — сфингомиелин; PC — фосфатидилхолин; LPC — лизофосфатидилхолин; CAR — карнитин; PS — фосфосерин; Cer — церамид; HexCer — гексацерамид; SulfoHexCer — сульфогексацерамид; TG — триглицерид; PC_O и PC_P — эфир-связанные фосфатидилхолины.

Источник: Осетрова и соавт., 2024.

Дальнейшее исследование выделило некоторые классы липидов, которые характеризовались наиболее значимой амплитудой различий, связанных с шизофренией, в обеих областях неокортекса. В частности, ацилкарнитины имели заметно более низкую интенсивность пика как в зоне BA22p, так и в зоне BA9 в обоих гистологических кластерах. Если бы ацилкарнитины были удалены из образца анализируемых классов липидов, корреляция между областями уменьшилась бы в обоих типах тканей, оставаясь положительной и статистически значимой в случае серого вещества (коэффициент корреляции Пирсона $R=0,49$, $p=0,03194$) и исчезая в случае белого вещества (коэффициент корреляции Пирсона $R=-0,05$, $p=0,57$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основные результаты

В настоящем исследовании при помощи метода MALDI-MSI анализировали кортикальные срезы, соответствующие зонам BA22p и BA9 головного мозга пациентов с шизофренией и здоровых лиц из контрольной группы. Результаты исследования свидетельствуют о том, что шизофрения связана с изменениями состава липидов двух исследованных областей. Примечательно, что наблюдалось примерно в два раза больше различий на срезах белого вещества зоны BA22p по сравнению с зоной BA9. Это подчеркивает различную связь шизофрении с этими двумя функционально и структурно разными кортикальными областями. Хотя результаты исследования показывают значительное совпадение изменений, связанных с шизофренией, между двумя исследованными областями головного мозга как в сером, так и в белом веществе, они также указывают на более сильную корреляцию связанных с шизофренией различий между двумя данными областями мозга в сером веществе по сравнению с белым веществом. Это означает, что, хотя дорсолатеральная префронтальная кора (BA9), часто изучаемая в исследованиях шизофрении область, разделяет большинство связанных с шизофренией изменений с анатомически отличной областью височной доли (BA22p), она демонстрирует меньше различий в подкорковом белом веществе.

Ограничения

Описываемое исследование имело ряд ограничений. Во-первых, количество образцов в группе пациентов

с шизофренией и контрольной группе, использованных для анализа, было ограничено 24, причем каждая группа была представлена шестью образцами каждой из двух областей головного мозга. Во-вторых, аннотация липидных соединений была ограничена расчетными прогнозами и не учитывала спектр фрагментированных соединений, что позволило бы провести более точную идентификацию. Тем не менее несмотря на эти ограничения, удалось наблюдать положительную корреляцию различий, связанных с шизофренией, между двумя независимо оцениваемыми областями головного мозга. Кроме того, хотя расчетная аннотация может быть неточной на уровне отдельных соединений, она гораздо более надежна на уровне классов липидов, что подтверждается сопоставлением результатов между областями головного мозга. Наконец, дизайн настоящего исследования не исключал потенциального влияния на липидный состав исследуемых областей мозга вмешивающихся факторов, таких как применение антипсихотических препаратов, которые, как было показано, оказывают влияние на мозг грызунов [37].

Кроме того, из-за ограниченного количества образцов, изученных в данном исследовании, индивидуальные эффекты, а также небольшие различия в поле и возрасте доноров между двумя наборами образцов могут повлиять на результаты. Однако тот факт, что степень связанных с шизофренией различий в подкорковом белом веществе пациентов с шизофренией в височной доле значимо выше по сравнению с префронтальной корой, в то время как в сером веществе такого отклонения нет, потребовал бы наличия анатомически и гистологически обусловленного влияния этих вмешивающихся переменных на липидом головного мозга. Это менее вероятно, чем истинный биологический эффект, учитывая предыдущие наблюдения более высокого уровня изменений экспрессии генов, связанных с зоной BA22p [29], и структурные MPT исследования [38].

Интерпретация

Сделанное наблюдение о большей степени изменений липидома, связанных с BA22p, хорошо согласуется с существующими знаниями об этой области. Многочисленные нейровизуализационные исследования ранее продемонстрировали существенные структурные нарушения в верхней височной

извилине, которая включает в себя зону BA22p, у пациентов с шизофренией [39]. Более того, изменение объема верхней височной извилины было напрямую связаны с тяжестью слуховых галлюцинаций у пациентов с шизофренией [40–42]. Недавнее исследование с использованием структурной МРТ пациентов с первым эпизодом шизофрении, не получавших лечения, показало значимые изменения содержания миелина в верхней височной извилине, но не в дорсолатеральной префронтальной коре [43]. Аналогичным образом, молекулярные исследования зоны BA22 выявили многочисленные изменения в транскриптоме и протеоме при шизофрении, которые влияют на клеточную адгезию, синаптическую передачу, наведение аксонов и пути энергетического метаболизма [26, 44]. Примечательно, что исследования экспрессии генов в головном мозге при шизофрении, изучавшие 12 и 15 различных областей неокортекса, включая дорсолатеральную префронтальную кору, неизменно выявляли наибольшее количество изменений в зоне BA22 [29, 45].

Описываемое исследование было направлено на оценку того, отражают ли различия липидома, связанные с шизофренией и обнаруженные в часто изучаемой области неокортекса головного мозга — зоне BA9, различия, присутствующие в других областях неокортекса. Кроме того, изучалось, может ли включение в исследование параметра пространственного разрешения помочь выявить дополнительные особенности в изменениях липидома, связанных с шизофренией. Полученные результаты демонстрируют, что подход пространственной липидомики действительно способен выявлять тонкие различия, связанных с шизофренией эффектов, между двумя обследуемыми областями неокортекса с высоким уровнем ассоциаций. Помимо выявления в целом меньшей связи шизофрении с липидным составом белого подкоркового вещества зоны BA9 по сравнению с зоной BA22p, также наблюдали существенные различия у ряда классов липидов в отношении амплитуды связанных с шизофренией эффектов между двумя областями. Интересно, что изменения были более заметными в кластерах серого вещества в двух исследованных областях, нежели в кластерах белого вещества. Среди наиболее распространенных классов липидов с консервативными

различиями в обеих областях были плазмалогены, которые ранее демонстрировали связь с шизофренией при изучении липидома плазмы [46–48]. Особый интерес представляли ацилкарнитины, которые имели высококонсервативные изменения с наибольшей амплитудой в обеих областях и обоих типах тканей, а также отвечали за статистически значимую корреляцию в случае белого вещества. У пациентов с шизофренией наблюдалось снижение уровня большинства ацилкарнитинов в плазме крови [47, 49], в то же время исследования, которые были сосредоточены на анализе транскриптома дорсолатеральной префронтальной коры головного мозга, выявили нарушение биосинтеза ацилкарнитинов, а также связь изменений содержания липидов с когнитивными симптомами шизофрении [15]. Таким образом, результаты настоящего исследования вписываются в общую картину липидных различий в тканях головного мозга, связанных с шизофренией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В совокупности полученные данные свидетельствуют о том, что включение других областей неокортекса за пределами дорсолатеральной префронтальной коры в молекулярное исследование, связанное с шизофренией, может дать многообещающее понимание патоморфологии этого заболевания. Более того, эти результаты подчеркивают ценность анализа с пространственным разрешением, который позволяет разделить участки неокортекса на области серого и белого вещества для анализа данных. Благодаря такому разделению удалось выявить существенные различия между этими двумя областями головного мозга по связанным с шизофренией изменениям в подкорковом белом веществе, но не выявили их в сером веществе коры. Это открытие подчеркивает необходимость дальнейших исследований с применением пространственного разрешения для лучшего понимания молекулярных изменений, связанных со сложными фенотипами головного мозга, такими как психические расстройства, включая шизофрению.

История публикации

Рукопись поступила: 11.12.2023

Рукопись принята: 27.08.2024

Опубликована онлайн: 20.09.2024

Вклад авторов: Методология — Ольга Ефимова, Глеб Владимиров и Елена Стекольников; концептуализация — Филипп Хайтович и Мария Осетрова; программное обеспечение — Мария Осетрова и Павел Мазин; валидация — Мария Осетрова; формальный анализ — Мария Осетрова и Марина Завольскова; исследование — Мария Осетрова и Марина Завольскова; ресурсы — Ольга Ефимова, Глеб Владимиров, Георгий Костюк и Евгений Николаев; обработка данных — Мария Осетрова, Марина Завольскова и Елена Стекольников; написание, проверка и редактирование текста — Мария Осетрова, Марина Завольскова; написание, рецензирование и редактирование — Денис Андреев, Яна Зоркина, Анна Морозова и Филипп Хайтович; визуализация — Мария Осетрова и Марина Завольскова; контроль — Филипп Хайтович; управление проектом — Филипп Хайтович. Все авторы прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование: Сбор образцов, измерения и первичный анализ данных были выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда в рамках гранта №22-15-00474. Интеграционный анализ данных был выполнен при финансовой поддержке РФФИ (Российский фонд фундаментальных исследований) в рамках исследовательского проекта №20-34-90146.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Дополнительная информация

Дополнительные материалы к этой статье можно найти в онлайн-версии:

Рисунок S1 <https://doi.org/10.17816/CP15488-145325>

Таблица S1 <https://doi.org/10.17816/CP15488-145326>

Таблица S2 <https://doi.org/10.17816/CP15488-145327>

Таблица S3 <https://doi.org/10.17816/CP15488-145328>

Таблица S4 <https://doi.org/10.17816/CP15488-145329>

Цитировать:

Осетрова М.С., Завольскова М.Д., Мазин П.В., Стекольников Е.А., Владимиров Г.Н., Ефимова О.И., Морозова А.Ю., Зоркина Я.А., Андреев Д.С., Костюк Г.П., Николаев Е.Н., Хайтович Ф.Е. Применение метода масс-спектрометрической визуализации двух областей неокортекса для выявления гистологической селективности липидных изменений, характерных для

шизофрении // *Consortium Psychiatricum*. 2024. Т.5, №3. CP15488. doi: 10.17816/CP15488

Сведения об авторах

***Мария Станиславовна Осетрова**, инженер-исследователь, Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологии; e-Library SPIN-код: 5813-1688, Scopus Author ID: 57505703600, Researcher ID: HON-3453-2023, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8174-9544>
E-mail: maria.osetrova.sk@gmail.com

Марина Дмитриевна Завольскова, стажер-исследователь, Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологии; e-Library SPIN-код: 1800-6986, Scopus Author ID: 57209106743, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4532-0721>

Павел Владимирович Мазин, к.б.н., старший биоинформатик, Институт Сенгера; e-Library SPIN-код: 2062-8545, Scopus Author ID: 20734870400, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9268-3352>

Елена Алексеевна Стекольников, к.х.н., старший научный сотрудник, Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологии; e-Library SPIN-код: 3859-4534, Scopus Author ID: 56462907300, Researcher ID: U-1735-2018, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8607-9773>

Глеб Николаевич Владимиров, к.ф.-м.н., старший научный сотрудник, Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологии; Scopus Author ID: 55579659300, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4623-4884>

Ольга Игоревна Ефимова, младший научный сотрудник, Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологии; e-Library SPIN-код: 3427-8085, Scopus Author ID: 15836570500, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0842-3203>

Анна Юрьевна Морозова, к.м.н., старший научный сотрудник, ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ»; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава РФ; e-Library SPIN-код: 3233-7638, Researcher ID: T-1361-2019, Scopus Author ID: 55648593900, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8681-5299>

Яна Александровна Зоркина, к.б.н., старший научный сотрудник, научно-клинический исследовательский центр нейропсихиатрии ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ»; ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского» Минздрава РФ; e-Library SPIN-код: 3017-3328, Researcher ID: H-2424-2013, Scopus Author ID: 54584719100, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0247-2717>

Денис Сергеевич Андреев, к.б.н., ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ»; Researcher ID: AAQ-6260-2020, Scopus Author ID: 6602608643, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3349-5391>

Георгий Петрович Костюк, д.м.н., профессор, главный врач ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева ДЗМ»; e-Library SPIN-код: 3424-4544, Researcher ID: AAA-1682-2020, Scopus Author ID: 57200081884, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3073-6305>

Евгений Николаевич Николаев, д.ф.-м.н., профессор, заведующий лабораторией масс-спектрометрии, Центр молекулярной и клеточной биологии, Сколковский институт науки и технологии; e-Library SPIN-код: 4984-1007, Scopus Author ID: 55394217800, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6209-2068>

Филипп Ефимович Хайтович, к.б.н, профессор, Директор центра нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Центр нейробиологии и нейрореабилитации имени Владимира Зельмана, Сколковский институт науки и технологии; Scopus Author ID: 6602559039, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4305-0054>

*автор, ответственный за переписку

Список литературы

1. Sontheimer H. Chapter 13 – Schizophrenia. In: Sontheimer H, editor. *Diseases of the Nervous System*. San Diego: Academic Press; 2015. p. 375–403.
2. He H, Liu Q, Li N, et al. Trends in the incidence and DALYs of schizophrenia at the global, regional and national levels: results from the Global Burden of Disease Study 2017. *Epidemiol Psychiatr Sci*. 2020;29:e91. doi: 10.1017/S2045796019000891
3. Subramaniam M, Abdin A, Vaingankarm JA, et al. Lifetime Prevalence and Correlates of Schizophrenia and Other Psychotic Disorders in Singapore. *Front Psychiatry*. 2021;12:650674. doi: 10.3389/fpsy.2021.650674
4. International Journal of Scientific Research [Internet]. Available from: [https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-\(IJSR\)](https://www.worldwidejournals.com/international-journal-of-scientific-research-(IJSR))
5. Zhu X, Xu T, Peng C, et al. Advances in MALDI Mass Spectrometry Imaging Single Cell and Tissues. *Front Chem*. 2021;9:782432. doi: 10.3389/fchem.2021.782432
6. Longuespée R, Casadonte R, Kriegsmann M, et al. ALDI mass spectrometry imaging: A cutting-edge tool for fundamental and clinical histopathology. *Proteomics Clin Appl*. 2016;10(7):701–719. doi: 10.1002/prca.201500140
7. Liu D, Liu X, Huang S, et al. Simultaneous Mapping of Amino Neurotransmitters and Nucleoside Neuromodulators on Brain Tissue Sections by On-Tissue Chemoselective Derivatization and MALDI-MSI. *Anal Chem*. 2023;95(45):16549–16557. doi: 10.1021/acs.analchem.3c0267
8. Matsumoto J, Sugiura Y, Yuki D, et al. Abnormal phospholipids distribution in the prefrontal cortex from a patient with schizophrenia revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2011;400(7):1933–1943. doi: 10.1007/s00216-011-4909-3
9. Kakuda N, Miyasaka T, Iwasaki N, et al. Distinct deposition of amyloid- β species in brains with Alzheimer's disease pathology visualized with MALDI imaging mass spectrometry. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5(1):73. doi: 10.1186/s40478-017-0477-x
10. Smith A, L'Imperio V, Ajello E, et al. The putative role of MALDI-MSI in the study of Membranous Nephropathy. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteomics*. 2017;1865(7):865–874. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.11.013
11. Lim J, Aguilan JT, Sellers RS, et al. Lipid mass spectrometry imaging and proteomic analysis of severe aortic stenosis. *J Mol Histol*. 2020;51(5):559–571. doi: 10.1007/s10735-020-09905-5
12. Wang D, Sun X, Maziade M, et al. Characterising phospholipids and free fatty acids in patients with schizophrenia: A case-control study. *World J Biol Psychiatry*. 2021;22(3):161–174. doi: 10.1080/15622975.2020.1769188
13. Yu Q, He Z, Zubkov D, et al. Lipidome alterations in human prefrontal cortex during development, aging, and cognitive disorders. *Mol Psychiatry*. 2020;25(11):2952–2969. doi: 10.1038/s41380-018-0200-8
14. Ghosh S, Dyer RA, Beasley CL. Evidence for altered cell membrane lipid composition in postmortem prefrontal white matter in bipolar disorder and schizophrenia. *J Psychiatr Res*. 2017;95:135–142. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.08.009
15. Maas DA, Martens MB, Nikos Prioivoulos N, et al. Key role for lipids in cognitive symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2020;10(1):399. doi: 10.1038/s41398-020-01084-x
16. Shimamoto-Mitsuyama C, Nakaya A, Esaki K, et al. Lipid Pathology of the Corpus Callosum in Schizophrenia and the Potential Role of Abnormal Gene Regulatory Networks with Reduced Microglial Marker Expression. *Cereb Cortex*. 2021;31(1):448–462. doi: 10.1093/cercor/bhaa236
17. Huang S, Wu SJ, Sansone G, et al. Layer 1 neocortex: Gating and integrating multidimensional signals. *Neuron*. 2024;112(2):184–200. doi: 10.1016/j.neuron.2023.09.041
18. Larkum ME, Petro LS, Sachdev RNS, et al. Perspective on Cortical Layering and Layer-Spanning Neuronal Elements. *Front Neuroanat*. 2018;12:56. doi: 10.3389/fnana.2018.00056
19. González de San Román E, Bidmon HJ, Malisic M, et al. Molecular composition of the human primary visual cortex profiled by multimodal mass spectrometry imaging. *Brain Struct Funct*. 2018;223(6):2767–2783. doi: 10.1007/s00429-018-1660-y
20. Smucny J, Hanks TD, Lesh TA, et al. Altered Associations Between Task Performance and Dorsolateral Prefrontal Cortex Activation During Cognitive Control in Schizophrenia. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging*. 2023;8(10):1050–1057. doi: 10.1016/j.bpsc.2023.05.010
21. Meiron O, Yaniv A, Rozenberg S, et al. Transcranial direct-current stimulation of the prefrontal cortex enhances working memory and suppresses pathological gamma power elevation in schizophrenia. *Expert Rev Neurother*. 2024;24(2):217–226. doi: 10.1080/14737175.2023.2294150
22. Gan H, Zhu J, Zhuo K, et al. High frequency repetitive transcranial magnetic stimulation of dorsomedial prefrontal cortex for negative symptoms in patients with schizophrenia: A double-blind, randomized controlled trial. *Psychiatry Res*. 2021;299:113876. doi: 10.1016/j.psychres.2021.113876
23. Smucny J, Carter CS, Maddock RJ. Magnetic resonance spectroscopic evidence of increased choline in the dorsolateral prefrontal and visual cortices in recent onset schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2022;770:136410. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136410
24. Shi C, Yu X, Cheung EFC, et al. Revisiting the therapeutic effect of rTMS on negative symptoms in schizophrenia: a meta-analysis. *Psychiatry Res*. 2014;215(3):505–513. doi: 10.1016/j.psychres.2013.12.019
25. Levitan C, Ward PB, Catts SV. Superior temporal gyral volumes and laterality correlates of auditory hallucinations in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1999;46(7):955–962. doi: 10.1016/s0006-3223(98)00373-4
26. Barnes MR, Huxley-Jones J, Maycox PP, et al. Transcription and pathway analysis of the superior temporal cortex and anterior prefrontal cortex in schizophrenia. *J Neurosci Res*. 2011;89(8):1218–1227. doi: 10.1002/jnr.22647
27. Huang KC, Yang KC, Lin H, et al. Transcriptome alterations of mitochondrial and coagulation function in schizophrenia by cortical sequencing analysis. *BMC Genomics*. 2014;15(Suppl 9):S6. doi: 10.1186/1471-2164-15-S9-S6
28. Diemel SJ, Fish KN, Lewis DA. The Nature of Prefrontal Cortical GABA Neuron Alterations in Schizophrenia: Markedly Lower

- Somatostatin and Parvalbumin Gene Expression Without Missing Neurons. *Am J Psychiatry*. 2023;180(7):495–507. doi: 10.1176/appi.ajp.20220676
29. Katsel P, Davis KL, Haroutunian V. Variations in myelin and oligodendrocyte-related gene expression across multiple brain regions in schizophrenia: a gene ontology study. *Schizophr Res*. 2005;79(2–3):157–173. doi: 10.1016/j.schres.2005.06.007
30. Bemis KD, Harry A, Eberlin LS, et al. Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments. *Bioinformatics*. 2015;31(14):2418–2420. doi: 10.1093/bioinformatics/btv146
31. McMillen JC, Fincher JA, Klein DR, et al. Effect of MALDI matrices on lipid analyses of biological tissues using MALDI-2 postionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2020;55(12):e4663. doi: 10.1002/jms.4663
32. Monopoli A, Ventura G, Aloia A, et al. Synthesis and Investigation of Novel CHCA-Derived Matrices for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Lipids. *Molecules*. 2022;27(8):2565. doi: 10.3390/molecules27082565
33. Dufresne M, Fisher JA, Patterson NH, et al. α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid and Tri-Potassium Citrate Salt Pre-Coated Silicon Nanopost Array Provides Enhanced Lipid Detection for High Spatial Resolution MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2021;93(36):12243–12249. doi: 10.1021/acs.analchem.1c01560
34. Thomas A, Charbonneau JL, Fournaise E, et al. Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. *Anal Chem*. 2012;84(4):2048–2054. doi: 10.1021/ac2033547
35. Angerer TB, Bour J, Biagi JL, et al. Evaluation of 6 MALDI-Matrices for 10 μ m Lipid Imaging and On-Tissue MSn with AP-MALDI-Orbitrap. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2022;33(5):760–771. doi: 10.1021/jasms.1c00327
36. Ripley BD. The R project in statistical computing. *MSOR Connect*. 2001;1(1):23–25. doi: 10.11120/MSOR.2001.01010023
37. Zhou CH, Xue SS, Xue F, et al. The impact of quetiapine on the brain lipidome in a cuprizone-induced mouse model of schizophrenia. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110707. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110707
38. Honea R, Crow TJ, Passingham D, et al. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry*. 2005;162(12):2233–2245. doi: 10.1176/appi.ajp.162.12.2233
39. Zhao J, Zhang Y, Liu F, et al. Abnormal global-brain functional connectivity and its relationship with cognitive deficits in drug-naïve first-episode adolescent-onset schizophrenia. *Brain Imaging Behav*. 2022;16(3):1303–1313. doi: 10.1007/s11682-021-00597-3
40. Shen X, Jiang F, Fang X, et al. Cognitive dysfunction and cortical structural abnormalities in first-episode drug-naïve schizophrenia patients with auditory verbal hallucination. *Front Psychiatry*. 2022;13:998807. doi: 10.3389/fpsy.2022.998807
41. Ysbæk-Nielsen AT, Gogolu RF, Tranter M, et al. Structural brain abnormalities in patients with schizophrenia spectrum disorders with and without auditory verbal hallucinations. *Psychiatry Res Neuroimaging*. 2024;344:111863. doi: 10.1016/j.pscychresns
42. Zhang M, Xiang H, Yang F, et al. Structural brain imaging abnormalities correlate with positive symptom in schizophrenia. *Neurosci Lett*. 2022;782:136683. doi: 10.1016/j.neulet.2022.136683
43. Wei W, Zhang Y, Li Y, et al. Depth-dependent abnormal cortical myelination in first-episode treatment-naïve schizophrenia. *Hum Brain Mapp*. 2020;41(10):2782–2793. doi: 10.1002/hbm.24977
44. Martins-de-Souza D, Gattaz WF, Schmitt A, et al. Proteome analysis of schizophrenia patients Wernicke's area reveals an energy metabolism dysregulation. *BMC Psychiatry*. 2009;9:17. doi: 10.1186/1471-244X-9-17
45. Katsel PL, Davis KL, Haroutunian V. Large-scale microarray studies of gene expression in multiple regions of the brain in schizophrenia and Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol*. 2005;63:41–82. doi: 10.1016/S0074-7742(05)63003-6
46. Kaddurah-Daouk R, McEvoy J, Baillie R, et al. Impaired plasmalogens in patients with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 2012;198(3): 347–352. doi: 10.1016/j.psychres.2012.02.019
47. Cao B, Wang D, Pan Z, et al. Characterizing acyl-carnitine biosignatures for schizophrenia: a longitudinal pre- and post-treatment study. *Transl Psychiatry*. 2019;9(1):19. doi: 10.1038/s41398-018-0353-x
48. Mednova IA, Chernonosov AA, Kornetova EG, et al. Levels of Acylcarnitines and Branched-Chain Amino Acids in Antipsychotic-Treated Patients with Paranoid Schizophrenia with Metabolic Syndrom. *Metabolites*. 2022;12(9). doi: 10.3390/metabo12090850
49. Mednova IA, Chernonosov AA, Kasakin MF, et al. Amino Acid and Acylcarnitine Levels in Chronic Patients with Schizophrenia: A Preliminary Study. *Metabolites*. 2021;11(1):34. doi: 10.3390/metabo11010034