

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТРЕВОЖНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ

М.Г. Узбекиов¹, Т.И. Сырейщикова², Н.М. Максимова¹, Н.В. Смолина¹,
Г.Е. Добрецов³, В.В. Бриллиантова¹, С.Н. Шихов¹

¹Московский научно-исследовательский институт психиатрии – филиал ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России

²Физический институт им. П.Н. Лебедева РАН

³Научный и клинический центр физико-химической медицины ФМБА, Москва

Депрессия является одним из наиболее распространенных заболеваний в мире и одной из основных причин потери трудоспособности [12]. За последние 10 лет каждый год около 5–7% людей в мировой популяции переносят большой депрессивный эпизод. Есть предположение, что в будущем один из шести человек в той или иной степени будет страдать от депрессии [13]. Депрессия – это также фактор риска многих серьезных соматических заболеваний. Она усугубляет их течение и создает риск развития осложнений и преждевременной смерти [3, 12].

Все это указывает на необходимость всестороннего исследования депрессий и ее патогенетических механизмов. При этом чрезвычайно важным является разработка подходов к прогнозу и оценке эффективности терапии депрессий.

В связи со сказанным выше отметим, что важным звеном нарушения молекулярных процессов при развитии патологических процессов в организме могут быть конформационные изменения белков, то есть ориентация белковой молекулы в пространстве [2]. Примером служат прионы – белки с нарушенной конформацией, которые приводят к психическим расстройствам [8].

Недавно полученные нами данные [4] показали, что при стрессе, шизофрении и ряде других патологических состояниях изменяются конформация и, соответственно, физико-химические свойства транспортного белка крови – альбумина. Напомним, что альбумин – главный (до 50% по массе) белок плазмы крови, выполняющий в организме важные функции. Альбумин, благодаря своим уникальным свойствам, сопрягает в организме множество метаболических процессов [1].

Однако до настоящего времени не решен вопрос: отражает ли нормальная концентрация альбумина в крови при патологических состояниях способность

молекулы альбумина выполнять все свои функции? Для ответа на этот вопрос требуется создать новую технологию анализа структурных изменений в молекулах альбумина, которая была бы, с одной стороны, высокочувствительной и, с другой стороны, достаточно простой для использования клиническими лабораториями.

Такие изменения могут быть выявлены при помощи различных биофизических методов: кристаллографических методов, методом ядерной магнитной спектроскопии, методом нерадиоактивного переноса энергии, методами равновесного диализа и ультрафильтрации, а также методом флуоресцентной спектроскопии [4]. Последний метод является наиболее информативным. В таких исследованиях важную роль играют специфические молекулярные флуоресцентные зонды. Зонды представляют собой аналоги естественных лигандов и лекарственных соединений и служат в качестве маркеров связывающих центров на белковой молекуле. Флуоресценция зондов чрезвычайно чувствительна к минимальным изменениям как конформации, так и физико-химических свойств белков [9]. Знание молекулярных процессов, связанных с конформационными изменениями молекулы альбумина при психических заболеваниях, будет способствовать улучшению диагностических процедур, установлению тяжести заболевания, прогнозу и оценке эффективности фармакотерапии.

Ранее нами были выявлены значительные биохимические нарушения у больных тревожной депрессией. Было установлено нарушение обмена моноаминов и кортизола, нарастание выраженности эндогенной интоксикации [6, 14].

В настоящей работе мы хотели бы представить некоторые данные нашей поисковой работы по изучению конформационных нарушений молекулы альбумина у больных тревожной депрессией в

процессе антидепрессивной терапии. Характерной особенностью работы является использование разрешенной во времени субнаносекундной флуоресцентной спектроскопии, позволяющей регистрировать малые локальные изменения и избирательно следить за состоянием связывающих центров альбумина.

Материалы и методы

Было обследовано 10 больных с тревожной депрессией. Состояние больных в соответствии с критериями МКБ-10 [15] оценивалось как депрессивный эпизод средней степени тяжести (F32.1) и рекуррентное депрессивное расстройство, текущий эпизод умеренной тяжести (F33.1). Наличие тревоги в структуре депрессии было основным показанием для включения в исследование. Состояние больных оценивалось клинико-психопатологическим методом, а также с помощью психометрического анализа выраженности депрессии с использованием шкалы Гамильтона для оценки депрессии (Hamilton Rating Scale for Depression – HDRS-21) [10] и шкалы тревоги Гамильтона для оценки тревоги (The Hamilton Anxiety Rating Scale – HARS) [11]. Психотерапия проводилась препаратом золофт (генерическое название – сертралин). Доза составляла 50 мг/сут, в качестве монотерапии. Пациенты обследовались при поступлении и через 2 недели от начала терапии.

В исследование не включались депрессивные расстройства, коморбидные с расстройствами галлюцинозными-бредового регистра, хроническим алкоголизмом, наркоманиями, психическими расстройствами, связанными с органическим поражением ЦНС. До начала обследования больные не должны были получать психотерапию в течение минимум 2-х недель. Контрольная группа состояла из 10 здоровых добровольцев без соматической и психической патологии.

Все обследуемые дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинской декларацией и решением локального этического комитета МНИИП (№ 16, 13.03.2017).

Было обследовано 8 женщин и 2 мужчин. Возраст: от 18 до 50 лет. Длительность заболевания – от 2 недель до 10 лет. Длительность текущего депрессивного эпизода – в среднем $6,3 \pm 0,43$ месяца. F.32.1 – 4 пациента; F.33.1 – 6 пациентов.

Для исследования конформационных изменений в молекуле альбумина был применен метод затухания флуоресценции зонда K-35, связанного с альбумином сыворотки крови больных [9]. Зонд K-35 (dimethylaminonaphthalic acid N-carboxyphenylimide, CAPIDAN) был синтезирован и любезно предоставлен профессором Б.М.Красовицким и его коллегами из Института монокристаллов Национальной Академии Наук Украины (Харьков).

В экспериментах сыворотка разбавлялась в 20 раз фосфатным буферным раствором, pH 7,4, 10 mM, содержащим 137 mM хлорида натрия. Конечная концентрация зонда CAPIDAN составляла 29,4 мкМ. Измерение затухания флуоресценции зонда CAPIDAN, связанного с сывороточным альбумином, проводили в нано- и пико-секундном диапазоне на лазерной установке, созданной в Физическом институте им. П.Н.Лебедева РАН. Источник света – LED (Laser Emission Diode) фирмы «Pico-Quant» с длиной волны излучения 405 нм или 459 нм и максимальной частотой импульсов 10 MHz при максимальной оптической мощности 30 μW. Ранее было показано, что зонд CAPIDAN является специфическим лигандом молекулы альбумина; в сыворотке крови не менее 95% зонда было связано с альбумином [4]. Установка – термостатирована, оснащена набором интерференционных фильтров для регистрации излучения в диапазоне 450–650 нм, а также поляризаторами излучения. Флуоресценцию регистрировали при 535 нм. Детектором фотонов служил фотоэлектронный умножитель Hamamatsu (PMA-182). Для коррелированного во времени счета одиночных фотонов флуоресценции применялась PCI-Board TimeHarp200 (фирма «PicoQuant»). Время – амплитудный конвертор содержит 4 096 каналов регистрации фотонов с шириной канала в 33 пикосекунды. Длительность импульсов возбуждающего излучения была около 700 пикосекунд, интервал повторения им пульсов – 100 нс. Время измерения одной пробы составляло 10 минут. На базе персонального компьютера типа AMD Sempron были автоматизированы как процесс измерения, так и обработка экспериментальных данных (программы TimeHarp и FluoFit фирмы «Pico-Quant») [5].

Полученные данные анализировались программой Fluofit (Picoquant), осуществляющей деконволюцию экспериментального закона затухания нелинейным методом наименьших квадратов и использующей χ^2 критерий. Лучшие параметры фитирования соответствовали минимуму χ^2 . Было получено, что наиболее точно интенсивность флуоресценции зонда $F(t)$ может быть представлена суммой трех экспоненциальных слагаемых: $F(t) = A_1 \cdot \exp(-t/t_1) + A_2 \cdot \exp(-t/t_2) + A_3 \cdot \exp(-t/t_3)$, где A_i – амплитуды, соответствующие трем связывающим центрам молекулы альбумина со временами затухания флуоресценции τ_i .

Различия между параметрами затухания флуоресценции в различных группах анализировались с помощью критерия Вилкоксона и рассматривались как достоверные при $p < 0,02$.

Результаты работы и их обсуждение

До начала терапии средний балл по шкале Гамильтона для оценки депрессии составлял – 24,3, а по шкале Гамильтона для оценки тревоги – 30,8.

На фоне проводимой терапии к концу 2 недели у абсолютного числа пациентов отмечалось значи-

тельное улучшение в состоянии. Средний балл по шкале Гамильтона для оценки депрессии составил – 6,3, по шкале Гамильтона для оценки тревоги – 5,5.

Теория взаимодействия зонда CAPIDAN с альбумином была описана ранее [4, 5]. Конформационные изменения в молекуле альбумина проявляются в различной интенсивности флуоресценции зондов, локализованных на различных связывающих центрах. Следует отметить, что соответствующие вариации во временных жизненных циклах флуоресценции не превышают 10–15%. Эксперименты с пробами альбумина сыворотки человека выявили различное влияние ионного состава раствора на структуру альбумина в сыворотке крови здоровых добровольцев и больных. Было проведено измерение кривых затухания флуоресценции при трех различных величинах ионной силы растворов. Наилучшие и наиболее стабильные результаты были получены при ионной силе раствора около 0,6 М (ионы KCl).

Результатом измерения и анализа затухания флуоресценции зонда CAPIDAN были характеристики трех центров связывания на молекуле альбумина в контрольных пробах с амплитудами A_1 , A_2 и A_3 , соответствующие трем временам затухания флуоресценции – 9, 3 и 1 наносекундам.

Наиболее выраженные результаты были получены при исследовании связывающего центра с амплитудой A_1 (9 наносекунд). В настоящей работе мы представим результаты, полученные при исследовании этого центра. Величины затухания флуоресценции для центра с амплитудой A_1 у контрольной группы и больных с тревожной депрессией до начала терапии достоверно различались – $p=0,02$ (по тесту Wilcoxon для независимых выборок). Так величины для центра с амплитудой A_1 для контрольной группы и больных с тревожной депрессией до начала терапии составляли $52,2\pm 1,4$ и $42,5\pm 2,2$ условных единиц, соответственно $p=0,02$. Через две недели фармакотерапии различия между величинами амплитуд A_1 у контрольной группы и у больных, прошедших терапию, были недостоверными: $52,2\pm 1,4$ и $48,8\pm 2,4$ условных единиц, соответственно $p=0,24$. (Связывающие центры с амплитудами A_2 и A_3 дали схожие результаты). То есть, лечение приблизило закон затухания флуоресценции зонда CAPIDAN в сыворотках больных депрессией к затуханию в сыворотках контрольной группы.

Полученные данные указывают, что антидепрессивная фармакотерапия способствует восстановлению конформации молекулы альбумина у больных тревожной депрессией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грызунов Ю.А., Добрецов Г.Е. (Ред.) Альбумин сыворотки крови в клинической медицине // М.: Ириус, 1994. С. 226.
2. Лопухин Ю.М., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. Конформационные изменения молекулы альбумина: новый тип реакции на патологический процесс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Т. 130. № 7. С. 4–8.
3. Краснов В.Н. Проблемы современной диагностики депрессий // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. № 11. С. 3–10.
4. Смолина Н.В., Сырейщикова Т.И., Узбеков М.Г., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды как источник клинически значимой информации // Монография. Фундаментальные науки – медицине. Биофизические медицинские технологии / Под ред. А.И. Григорьевой и Ю.А. Владимировой. М.: «МАКС ПРЕСС», 2015. Т. 2. С. 293–327.
5. Сырейщикова Т.И., Смолина Н.В., Узбеков М.Г., Добрецов Г.Е., Калинина В.В., Крюков В.В., Антипова О.С., Емельянова И.Н., Краснов В.Н. Нарушение конформации альбумина сыворотки у больных меланхолической депрессией // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 1. С. 56–59.
6. Узбеков М.Г., Максимова Н.М. Некоторые нейробиологические аспекты патогенеза тревожной депрессии и антиглюкокортикоидная фармакотерапия // Российский психиатрический журнал. 2018. № 2. С. 31–39.
7. Узбеков М.Г., Смолина Н.В., Миссионщик Э.Ю., Молодецких А.В., Добрецов Г.Е., Грызунов Ю.А. Нарушение конформации связывающих центров сывороточного альбумина при шизофрении // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008. Т. 108. № 5. С. 67–70.
8. Aguzzi A., Baumann F., Bremer J. The prion's elusive reason for being // Ann. Rev. Neurosci. 2008. Vol. 31. P. 439–477.
9. Dobretsov G., Syrejschchikova T., Smolina N.V., Uzbekov M.G. CAPIDAN, a fluorescent reporter for detection of albumin drug-binding site changes // Human Serum Albumin (HAS / Ed.: Travis Stokes. Nova Science Publishers. 2015. Chapter 7. P. 129–171.
10. Hamilton M. A rating scale for depression // J. Neurol. Neurosurgery Psychiatry. 1960. Vol. 23. P. 56–62.
11. Hamilton M. Diagnosis and Rating of Anxiety // Br. J. Psychiatry. 1969. Vol. 3. P. 76–79.
12. Kessler R.C., Ustun T.B. (Eds.) The WHO World Mental Health Surveys. Global perspectives on the epidemiology of mental disorders. NY.: Cambridge University Press, 2008.
13. Spinney L. European Brain Policy Forum 2009: depression and the European society // Eur. Psychiatry. 2009. Vol. 24. P. 550–551.
14. Uzbekov M., Misionzhnik E., Maximova N., Vertogradova O. Biochemical profile in patients with anxious depression under the treatment with serotonergic antidepressants with different mechanisms of action // Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental. 2006. Vol. 21. P. 109–115.
15. World Health Organization, International Classification of Diseases and Related Problems. (10th Ed.). Clinical Modification. WHO. Geneva. Switzerland, 2015.

КОНФОРМАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МОЛЕКУЛЫ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ТРЕВОЖНОЙ ДЕПРЕССИЕЙ

М.Г. Узбеков, Т.И. Сырейщикова, Н.М. Максимова, Н.В. Смолина, Г.Е. Добрецов, В.В. Бриллиантова, С.Н. Шихов

Исследовались конформационные нарушения молекулы альбумина у больных тревожной депрессией в процессе антидепрессивной терапии (препарат – золофт/сертралин) путем использования разрешенной во времени субнаносекундной флуоресцентной спектроскопии. Объектом исследования служили 10 больных с тревожной депрессией и 10 здоровых добровольцев без соматической и психической патологии. На фоне проводимой терапии к концу 2 недели у абсолютного числа пациентов отмечалось значительное улучшение в состоянии. Величины затухания флуоресценции в контрольной группе и у больных тревожной депрессией

до начала терапии достоверно различались: $52,2\pm 1,4$ и $42,5\pm 2,2$ условных единиц, соответственно $p=0,02$. Через две недели фармакотерапии различия между контрольной группой и группой больных, прошедших терапию, были недостоверными: $52,2\pm 1,4$ и $48,8\pm 2,4$ условных единиц, соответственно $p=0,24$. Полученные данные указывают, что антидепрессивная фармакотерапия способствует восстановлению конформации молекулы альбумина у больных тревожной депрессией.

Ключевые слова: конформация, альбумин, лазерная субнаносекундная флуоресценция, тревожная депрессия, сертралин.

CONFORMATIONAL CHANGES OF BLOOD SERUM ALBUMIN MOLECULE IN PATIENTS WITH ANXIOUS DEPRESSION

**M.G. Uzbekov, T.I. Syrejshchikova, N.M. Maximova, N.V. Smolina,
G.E. Dobretsov, V.V. Brilliantova, S.N. Shikhov**

There were investigated conformational disturbances of albumin molecule in patients with anxious depression under antidepressive therapy (sertraline) using time resolved subnanosecond fluorescence spectroscopy. There were investigated 10 patients with anxious depression and 10 healthy volunteers (control). Values of fluorescence decay in control group and in patients with anxious depression before therapy differed significantly: 52.2 ± 1.4 and 42.5 ± 2.2 arbitrary units, respectively, ($p=0.02$). Patient's state improved significantly after 2

weeks of the therapy and differences in values of fluorescence decay between these two groups (control and patients after therapy) were insignificant: 52.2 ± 1.4 and 48.8 ± 2.4 arbitrary units, respectively, ($p=0.24$). Our data point out that antidepressive pharmacotherapy promotes the recovery of albumin conformation in patients with anxious depression.

Key words: conformation, albumin, laser subnanosecond fluorescence, anxious depression, sertraline.

Узбеков Марат Галиевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории патологии мозга Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П.Сербского» Минздрава России; e-mail: uzbekovmg@gmail.com

Сырейщикова Татьяна Ивановна – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Физического института им. П.Н.Лебедева РАН; e-mail: syrej@lebedev.ru

Максимова Натэлла Маратовна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России; e-mail: dr.maximova@bk.ru

Смолина Наталья Владимировна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии мозга Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П.Сербского» Минздрава России; e-mail: esmolina@mail.ru

Добрецов Геннадий Евгеньевич – доктор физико-математических наук, профессор, главный научный сотрудник Научного и клинического центра физико-химической медицины ФМБА; e-mail: gdobretsov@mail.ru

Бриллиантова Варвара Витальевна – младший научный сотрудник лаборатории патологии мозга Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России; e-mail: varvara-bf@list.ru

Шихов Сергей Николаевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории патологии мозга Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России; e-mail: shelst@mail.ru