

СНИЖЕНИЕ 43 кДа ИММУНОРЕАКТИВНОЙ ФРАКЦИИ БЕЛКА-ПЕРЕНОСЧИКА СЕРТОНИНА В ТРОМБОЦИТАХ КОРРЕЛИРУЕТ С ДЕПРЕССИВНОЙ СИМПТОМАТИКОЙ У БОЛЬНЫХ С СОМАТОФОРМНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ.

А.Р. БЕЛОУС, С. РАММАМУРТИ¹, Р.Д. БЛЭКЛИ¹, М.И. ФАКТОР,
Р.Х. ЛОЗИЕР А.М. ДУПИН, А.Г. БЕЧИАШВИЛИ², М.А. МОРОЗОВА²,
О.С. БРУСОВ

Лаборатория клинической биохимии, Научный Центр Психического Здоровья РАМН,
Загородное шоссе 2, корп. 2, 113152, Москва, Россия

¹-Факультет Фармакологии, Центр Молекулярных Нейронаук, Медицинский Центр
Вандербильтского Университета, Нэшвилл, Теннесси, США

²-Факультет Эндогенных Психических Расстройств и Аффективных Состояний, Научный
Центр Психического Здоровья РАМН, Каширское ш., 34, Москва, Россия

Для выяснения роли белка-переносчика серотонина или серотонинового транспортера (СТ) в развитии соматоформных расстройств (СР) было проведено ассоциативное исследование уровня иммунореактивного СТ (ИР-СТ) с помощью сайт-специфичных антител, направленных на консервативный в ряду других котранспортеров эпитоп С-концевого фрагмента СТ. 22 пациента, отвечающих критериям DSM-IV для соматоформных расстройств, и 32 психически здоровых донора, разделенных по возрасту и полу, участвовали в данном исследовании. ИР-СТ тромбоцитов здоровых доноров выявлялся в виде диффузной полосы между 75 и 102 кДа и более четкой полосы на уровне 43 кДа. Нами было выявлено практически полное исчезновение 43 кДа ИР-СТ белка у пациентов с СТ по сравнению с той же полосой у здоровых индивидуумов. Депрессивное состояние всех пациентов было оценено по Депрессивной Шкале Гамильтона (HDRS) как минимум двумя психиатрами. Статистически значимая отрицательная корреляция была выявлена между резко сниженным ИР-СТ и общей суммой баллов HDRS у больных с СР ($r = -0,83$; $p < 0,000001$ по Спирману). Данная находка позволяет думать о нарушении процессинга СТ или альтернативном сплайсинге гена, кодирующего СТ у больных с СР, что, возможно, отражает дисфункцию нейротрансмиттерной передачи в ЦНС.

Ключевые слова: серотониновый транспортер, белок-переносчик серотонина, человеческие тромбоциты, антитела, соматоформные расстройства, биологические маркеры.

ВВЕДЕНИЕ. Белок-переносчик серотонина или серотониновый транспортер (СТ) осуществляет функцию обратного захвата и переноса серотонина (5-НТ) из синаптической щели в пресинаптическую терминаль, тем самым уменьшая воздействие серотонина на рецепторы постсинаптической мембраны [1-4]. Блокада СТ селективными и неселективными антидепрессантами приводит к быстрому увеличению концентрации 5-НТ в синаптической щели и способствует улучшению состояния больных с различной психиатрической патологией, прежде всего, аффективной, что одновременно свидетельствует об участии СТ в патогенезе психических заболеваний. Среди них следует, прежде всего, выделить депрессивные и тревожные состояния [5-7]. Серотониновый транспортер является фармакологической мишенью для кокаина и

амфетаминов, включая 3,4-метилendioкси-метамфетамин (MDMA, «экстази») [8;9]. Кроме того, молекулы СТ представлены на плазматических мембранах тромбоцитов [10,11], легочного эндотелия [12] и плацентарного эпителия [13], где они участвуют в системном гомеостазе серотонина [14].

Учитывая то, что мозговой и тромбоцитарный СТ кодируются общим геном, локализованным в 17q11.1-17q12 хромосоме [15], формируются из идентичных полипептидных цепей и различаются лишь посттрансляционной модификацией [16], общепринятым является использование тромбоцитов в качестве модели пресинаптической терминали серотонергического синапса головного мозга для оценки функциональной активности серотониновой системы при различных психических заболеваниях [17]. Рядом авторов были показаны различия транспорта серотонина, а также связывания антидепрессантов с СТ на тромбоцитарной модели у пациентов с разнообразной психиатрической и неврологической патологией, включая депрессии и суицид [18-22], шизофрению [23, 24]; болезнь Альцгеймера [25], болезнь Паркинсона [25-26], прогрессирующий паралич [27] и алкоголизм [28]. В данной работе представлена клиническая значимость белковой гетерогенности СТ, а именно его иммунореактивной фракции с молекулярным весом 43 кДа, у больных с соматоформными расстройствами, что представляет диагностическую ценность. Возможно, также, использование представленной модели для оценки эффективности психотропной терапии у пациентов с данной патологией.

МЕТОДИКА. СТ тромбоцитов больных и здоровых исследовался с помощью иммуноблоттинга (Western Blot, ECL) как описано Qian et al., 1995 [16] с использованием антител № 50, № 48 и СТ-2, разработанных на базе лаборатории фармакологии Вандербильтского Университета, (США), направленных на С-концевой фрагмент СТ (см. рис.1). Антитела № 50 были получены аналогичным способом, как и СТ-2 антитела (см. Qian et al., 1995 [16]). Тромбоциты больных и здоровых были собраны, как описано [29]. Мембраны блотов были преблокированы в 5% нежирном молоке, и инкубировались с антителами в концентрации 2 мкг/мл 1 час при комнатной температуре. Для эксперимента с преабсорбцией антител и фьюжен-белка №50 антитела преинкубировались с фьюжен-белком (рис. 3), как описано Qian et al., 1995 [16]. Концентрация белка измерялась с помощью метода Lowry, модифицированной Peterson (1997) с использованием бычьего альбумина как стандарта. Уровень (в % от Дстд.) оценивался денситометрически с помощью компьютерных программ Band Leader Application Program, Version 3.00 и Excel, Version 7.00.

Описание группы пациентов и здоровых доноров.

22 пациента, отвечающих критериям DSM-IV для соматоформных расстройств (СР) (16 женщин и 6 мужчин; 40 ± 14 лет) участвовали в исследовании. Пациенты были обследованы клиницистами в гастроэнтерологическом отделении и интервьюированы психиатром. Все пациенты были оценены по Депрессивной Шкале Гамильтона (HDRS; Hamilton, 1967 [30]). Данные шкалирования были занесены в протоколы исследования до начала психотропной терапии. Наблюдались два типа симптомов у обследуемых пациентов: соматические и психические. Соматические симптомы проявлялись острыми или подострыми болями в области живота. Симптомы со стороны психики включали тревожные и панические расстройства, дистимию и депрессию, расстройства сна и аппетита и/или астению. По причине выраженной боли тревожное состояние пациентов доминировало, но при тщательном обследовании психиатром были выявлены и документированы симптомы депрессии.

Как минимум три дня перед забором крови пациенты не получали психотропной терапии (за исключением небольших доз бензодиазепинов).

32 психически здоровых донора (18 женщин и 14 мужчин; 26 ± 5 лет) были включены в контрольную группу. Тромбоциты от 5 здоровых доноров были объединены в одну пробу, солиubilизированы, как описано в Материалах исследования и приняты за

Стандартного Донора (Д std). Дстд.-проба наносилась на каждый гель в качестве контроля.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Возможность прямого выявления иммунореактивных фракций серотонинового транспортера (СТ) в денатурирующих условиях с помощью иммуноблоттинга (Western blot) открыла перспективу визуализации эндогенной экспрессии СТ. Тромбоциты здоровых индивидуумов были собраны, солубилизованы и подвержены иммуноблоттингу (см. Материалы исследования) с различными антителами, направленными на С-концевого фрагмента СТ, значительно консервативной по отношению к другим транспортерам.

№ 50 поликлональные антитела, № 48 афинно-очищенные поликлональные антитела и СТ-2 поликлональные антитела направлены на пептиды С-концевого фрагмента СТ, состоящие из 19 (с 596 по 614 аминокислоту), 27 (с 596 по 622 аминокислоту) и 32 (весь внутриклеточный С-фрагмент СТ) соответственно (Рис.1).

Иммунореактивность тромбоцитарного СТ (СТ-ИР) психически здорового индивидуума визуализируется как диффузная полоса между 73 и 110 кДа и более четкая полоса с молекулярным весом 43 кДа в иммуноблоттинге со всеми упомянутыми выше антителами: № 50, № 48 и СТ-2 (Рис.2)

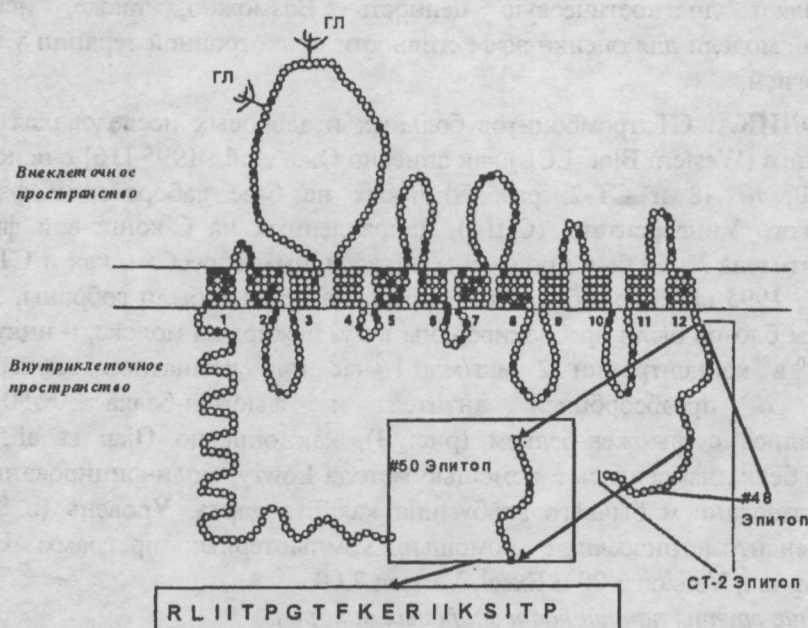


Рисунок 1.

Полипептид, состоящий из 630 аминокислот, предсказанный по данным клонированной кДНК СТ человека (Blakely et al., [7]; Hoffman et al., [8]) предположительно состоит из 12 трансмембранных доменов по данным гидрофобного анализа. ГЛ- распознанные позиции аспарагиновых остатков-- канонических мест N-гликозилирования. № 50, № 48 фьюжен-белки антител, направленных на С-терминаль крысиного СТ, пептиды 596-614 и 596-622 соответственно. № 50 и № 48 были получены аналогичным методом, как и СТ-2 антитела (Qian et al., [15])

Контрольная серия иммуноблоттингов с № 50, а также с № 50, преабсорбированной с № 50-фьюжен белком и № 50 преиммунной сывороткой (см. Методы исследования) выявила результаты, представленные на Рис.3.

Субклеточное фракционирование СТ (как описано в Материалах и Методах) выявило внутриклеточную мембранную локализацию 43 кДа-полосы. Принадлежность 43 кДа ИР-СТ внутриклеточным мембранам эндоплазматического ретикулума доказывает контрольный иммуноблот того же материала с моноклональными антителами к кальнексину (90 кДа) (Рис. 4).

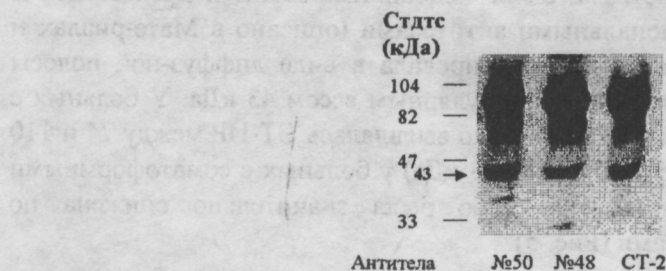


Рисунок 2.

Иммунореактивность тромбоцитарного СТ (СТ-ИР) психически здорового индивидуума визуализируется как диффузная полоса между 73 и 110 кДа и более четкая полоса с молекулярным весом 43 кДа в иммуноблоттинге с: № 50, № 48 и СТ-2 антителами (см. Материалы исследования).

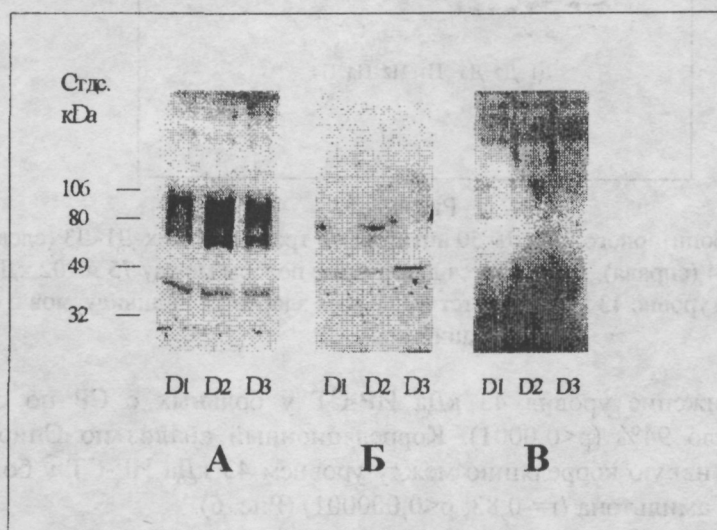


Рисунок 3.

Контрольная серия иммуноблоттингов с № 50, а также с № 50, преабсорбированной с № 50-фьюжен белком и № 50 преиммунной сывороткой (см. Методы исследования). Иммуноблот с тромбоцитами трех здоровых индивидуумов выявляет диффузные полосы между 75 и 102 кДа и более четкую полосу на уровне 43 кДа (А); преабсорбция № 50 антител с фьюжен-белком (Б); тот же иммуноблот, инкубированный с № 50 преиммунной сывороткой (В).

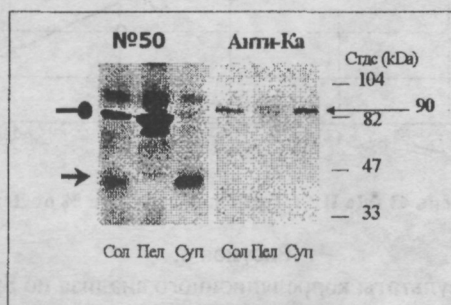


Рисунок 4.

Субклеточное фракционирование СТ (см. Материалы исследования). Выявлена внутриклеточная мембранная локализация 43 кДа-полосы (иммуноблот слева). Принадлежность 43 кДа ИР-СТ внутриклеточным мембранам эндоплазматического ретикулула доказывает контрольный иммуноблот того же материала с моноклональными антителами к кальнексину (90 кДа) (тот же иммуноблот справа).

Тромбоциты психически здоровых индивидуумов и пациентов с соматоформными и шизоаффективными расстройствами были солубилизированы и представлены для иммуноблоттинга с № 50 поликлональными антителами (описано в Материалах и Методах). У здоровых индивидуумов СТ-ИР мигрировала в виде диффузной полосы между 74 и 110 кДа и более четкой полосы с молекулярным весом 43 кДа. У больных с соматоформной и шизоаффективной патологией четко выявлялась СТ-ИР между 74 и 110 кДа. Между тем, низкомолекулярная фракция СТ (43 кДа) у больных с соматоформными расстройствами либо вообще отсутствовала, либо была значительно снижена по сравнению со здоровыми индивидуумами (Рис. 5).

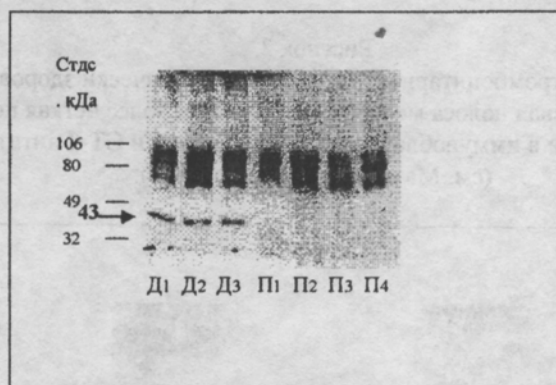
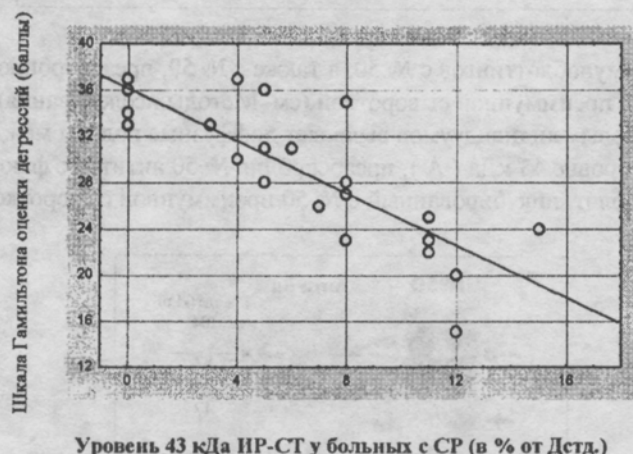


Рисунок 5.

Иммуноблот тромбоцитарного СТ с № 50 антителами трех здоровых-Д1-Д3 (слева) и четырех пациентов с СР П1-П4 (справа). Выявляются диффузные полосы между 75 и 102 кДа у здоровых и больных. Полосу на уровне 43 кДа присутствует у всех здоровых индивидуумов и отсутствует у пациентов с СР.

Среднее снижение уровня 43 кДа ИР-СТ у больных с СР по сравнению со здоровыми составило 94% ($p < 0,0001$). Корреляционный анализ по Спирману выявил значительную негативную корреляцию между уровнем 43 кДа ИР-СТ у больных с СР и шкалой депрессий Гамильтона ($r = -0,83$; $p < 0,000001$) (Рис. 6).



Уровень 43 кДа ИР-СТ у больных с СР (в % от Дстд.)

Рисунок 6.

Диаграмма, отражающая результаты корреляционного анализа по Spearman между уровнем 43 кДа ИР-СТ у больных с СР и Шкалой Депрессий Гамильтона ($r = -0,83$; $p < 0,000001$).

Таким образом, данная находка позволяет думать о нарушении процессинга СТ (возможно различного гликозилирования СТ у здоровых и больных) или альтернативном сплайсинге гена, кодирующего СТ, у больных с СР, что, возможно,

отражает дисфункцию нейротрансмиттерной передачи в ЦНС. Безусловно, требуются дальнейшие более углубленные исследования по выяснению механизмов нарушения предполагаемых процессов в норме и патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ross S.B., Renyi A.L. (1967), *Life Sci*, 6, 1407-1415.
2. Kuhar M.J., Roth R.H., Aghajanian G.K. (1972), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 181, 36-45.
3. O'Reilly C.A., Reith M.E.A. (1988), *J. Biol. Chem.*, 263, 6115-6121.
4. Bruns D., Engert F., Lux H.D. (1993), *Neuron*, 10, 559-572.
5. Fuller R.W., Wong D.T. (1990), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 600, 68-78.
6. Owens M.J., Nemeroff C.B. (1994), *Clin Chem.*, 40, 288-295.
7. Blakely R.D., Berson H.E., Eremeanu R.T., Jr. Caron M.G., Peek M.M., Prince H.K., Bradley C.C. (1991), *Nature*, 354, 66-70.
8. Hoffman B.J., Mezey E., Brownstein M.J. (1991) *Science*, 254, 579-580.
9. Sneddon J.M. (1973) *Progr. Neurobiol.*, 1, 153-198.
10. Rudnick G. (1977) *J. Biol. Chem.*, 252, 2170-2174.
11. Gillis C.N. (1985), In: *Serotonin and the cardiovascular system* (Vanhoutte PM, ed). pp 27-36. New York: Raven.
12. Balkovetz D.F., Tiruppathi C., Leibach F.H., Mahesh V.B., Ganapathy V. (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 2195-2198.
13. Fozard J.R. (ed) (1989) *Peripheral actions of 5-hydroxytryptamine*. New York: Oxford UP.
14. Ramamoorthy S., Bauman A.L., Moore K.R., Han H., Yang-Eeng T., Chang A.S., Ganapathy V., Blakely R.D. (1993), *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 2542-2546.
15. Qian Y., Melikian H.L., Rye D.B., Levey A.I., Blakely R.D. (1995), *J. Neuroscience* 15, 1261-1274.
16. Slahl S.M. (1977) *Arch. Gen. Psychiatry*, 34, 509-516.
17. Tuomisto J., Tukianen E. (1976) *Nature* 262, 596-598.
18. Meltzer H.Y., Arora R.C., Baber R., Tricou B.J. (1981) *Arch Gen Psychiatry* 38, 1322-1326.
19. Paul S.M., Rehavi M., Skolnick P., Ballenger J.C., Goodwin E.K. (1981) *Arch. Gen. Psychiatry*, 38, 1315-1318.
20. Stanly M., Virgilio J., Gershon S. (1982) *Science*, 216, 1337-1339.
21. Nemeroff C.B., Knight D.L., Krishnan K.R.R., Slolkin T.A., Bissette G., Melville M.L., Blaer D.G. (1988) *Arch Gen Psychiatry*, 45, 919-923.
22. Kaplan R.D., Mann J.J., (1982) *Life Sci.*, 31, 583-588.
23. Joyce J.N., Shane A., Lexow N., Winokur A., Casanova M.F., Kleinman J.E. (1993) *Neuropsychopharmacology*, 8, 315-336.
24. D'Amato R.J., Zweig R.M., Whitehouse P.J., Wenk G.L., Singer H.S., Mayeux R., Price D.L., Snyder S.H. (1987) *Ann Neurol.*, 22, 229-236.
25. Raisman G., Cash R., Agid Y. (1986) *Neurology*, 36, 556-560.
26. Chinaglia G., Landwehrmeyer B., Probst A., Palacios J.M. (1993) *Neuroscience*, 54, 691-699.
27. Daoust M., Lhuintre J.P., Ernouf D., Legrand E., Breton P., Boucly P., (1991) *Life Sci.*, 48, 977-983.
28. Katasonov A.B., Brusov O.S., Beliaev, Zlobina G.P., Factor M.I., Larionova T.B., Trunte K., Lideman R.R. (1989) *Psychiat. Neurol. med. Psychol. Leipzig* 41, 210-217.
29. Hamilton N. (1967) *Br. J. Soc. Exp. Psychol.*, 6, 278-296.

Поступила 04.04.99.

LOSS OF SEROTONIN TRANSPORTER IMMUNOREACTIVE 43-kDa PROTEIN IN PLATELETS FROM PATIENTS WITH SOMATOFORM DISORDERS CORRELATES WITH DEPRESSIVE SYMPTOMS

A.R. BELOUS, S. RAMAMOOTHY¹, R.D. BLAKELY¹, M.I. FACTOR, R. Y. LOZIER, A.M. DUPIN, A.G. BECHIASHVILI², M.A. MOROZOVA², O.S. BRUSOV

Laboratory of Clinical Biochemistry, Mental Health Research Center, RAMS, Zagorodnoe Shosse 2, korp. 2, 113152, Moscow Russia

¹Department of Pharmacology, Center for Molecular Neuroscience, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232-6600, USA

²Department of Endogenous Mental Disorders and Affective States, Mental Health Research Center, RAMS, Kashirskoye Shosse, 34, Moscow, Russia

To elucidate the role of serotonin transporter (SERT) protein as a candidate target for somatoform disorders (SD), we have performed an association study of the SERT immunoreactive (IR-SERT) protein level by using site-specific antibodies directed at C-terminus epitope poorly conserved among other cotransporters. 22 patients who met DSM-IV criteria for SD and 32 healthy volunteers matched in sex and age participated in the study. In platelets from all healthy donors, IR-SERT proteins migrates as a diffuse band between 75 and 102 kDa and a major sharper band at 43 kDa. We revealed almost complete disappearance of platelet 43 kDa IR-SERT protein in all patients with SD. All patients were rated with Hamilton Depressive Rating Scale (HDRS). There were found a significant negative correlation between residual IR-SERT 43kDa protein level and HDRS Scores [$r = -0.83$; $P < 0.000001$]. These findings suggest that a biosynthetic or processing abnormality may exist in SERTs in the affected population and may reflect the dysfunction of serotonin neurotransmission in CNS.

Key words: Serotonin transporter, human platelets, antibody, somatoform disorders, biological markers