

ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ И АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ В СЛЮНЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ ЛЮДЕЙ ПРИ ЭМОЦИОНАЛЬНОМ НАПРЯЖЕНИИ

А.И. ЛУКАШ, В.Г. ЗАЙКА*, Н.П. МИЛЮТИНА, А.О. КУЧЕРЕНКО

Ростовский государственный университет, 344006, Ростов-на-Дону,
ул. Большая Садовая, 105

*Ростовский государственный медицинский университет, 344022, Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 31 Б

Изучали интенсивность свободнорадикальных процессов (СРП) и активность антиоксидантных (АО) систем в слюне и плазме крови людей при физиологическом эмоциональном напряжении и при депрессивных патологиях (до и после лечения). Обнаружены значительные сдвиги в динамике исследованных показателей при разном эмоциональном напряжении, причем более выраженные изменения происходили в слюне. После проведенного курса лечения наблюдали стабилизацию интенсивности СРП и активности АО защиты. Наличие обнаруженных корреляций плазма-слюна исследованных показателей свидетельствуют об эффективности изучения слюны при эмоциональном напряжении и о перспективности использования слюны для оценки проводимой терапии.

Ключевые слова: эмоциональное напряжение, депрессивные патологии, свободнорадикальные процессы, антиоксидантная система, плазма, слюна.

ВВЕДЕНИЕ. Разное функциональное и патологическое эмоциональное напряжение является наиболее часто встречающимся состоянием у трудоспособного населения. Именно при таких кратковременных или продолжительных ситуациях возникают различной степени выраженности острые или хронические, часто повторяющиеся эмоциональные стрессы, которые являются ведущей причиной развития аффективных расстройств и, особенно, депрессивных состояний. На фоне длительного и непрерывного стресса возникает сложное взаимодействие стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем, которое в конечном итоге определяет эффективность функционирования компенсаторных механизмов.

Стресс-реакция, являющаяся необходимым звеном адаптации, сопровождается изменением интенсивности свободнорадикальных процессов (СРП) и перекисного окисления липидов, которые вызывают нарушения структурной организации и функций биомембран [1].

Вследствие важности мембранных структур в реализации различных биохимических и физиологических функций организма, изучение интенсивности СРП и активности антиоксидантных (АО) ферментов при разном эмоциональном напряжении может иметь существенное значение в диагностике, своевременной

коррекции сдвигов метаболизма и в оценке эффективности лечения депрессивных патологий.

Для понимания механизмов развития СРП в организме человека и функционирования АО систем в норме и при патологических состояниях перспективным является исследование слюны как наиболее доступной для анализа биологической жидкости организма.

В связи с этим целью настоящей работы явилось сравнительное изучение интенсивности СРП и активности ферментов АО защиты в плазме крови и слюне людей при разных формах эмоционального напряжения.

МЕТОДИКА. Пробы слюны и крови брали утром натощак. Венозную кровь стабилизировали гепарином "Биохеми" (Австрия) 5000 МЕ/мл из расчета одна капля гепарина на 10 мл крови. Слюну собирали после предварительного ополаскивания ротовой полости физиологическим раствором без стимуляции. Пробы крови и слюны центрифугировали 15 мин. при 3000 об/мин, для исследований использовали надосадочную жидкость. Оценку эмоционального состояния проводили у двух групп людей. Первую группу составили 12 практически здоровых студентов-добровольцев в возрасте 23-28 лет. Данную группу обследовали дважды: при нормальном физиологическом состоянии (контроль) и во время эмоционального напряжения, вызванного экзаменационной обстановкой. Вторая группа состояла из 23 больных, находившихся на стационарном лечении в психиатрическом отделении Ростовского государственного медицинского университета, психическое состояние которых соответствовало по МКБ-10 критериям депрессивного эпизода (6 человек) и рекуррентного депрессивного расстройства (17 человек). Взятие проб осуществляли при поступлении в стационар и при выписке, после проведенного курса лечения, который включал применение нейрорепрессантов, антидепрессантов и ноотропов.

В плазме крови и слюне определяли интенсивность хемилюминесценции (ХЛ), содержание малонового альдегида (МДА), супероксидустраняющую активность (СУА), активность каталазы и содержание общего белка.

Интенсивность ХЛ регистрировали на хемилюминометре с использованием ФЭУ-37 в качестве детектора в режиме счета фотонов.

Для оценки продукции OH^\bullet и O_2^\bullet радикалов измеряли светосумму ХЛ за 500 в системе люминол-трис- HCl буфер ($\text{pH}=7,35$) от момента введения в реакционную кювету перекиси водорода [2].

Для регистрации свободнорадикальных процессов ПОЛ ХЛ плазмы крови (слюны) индуцировали 25 мМ раствором сульфата железа в присутствии родамина 6 Ж, регистрируя светосумму за 500 с и высоту быстрой и медленной вспышек [3].

Определение МДА осуществляли по его реакции с тиобарбитуровой кислотой [4].

Антирадикальная система (СУА) включает как внеклеточную супероксиддисмутазу (СОД), так и другие компоненты, устраняющие супероксидный радикал (стероиды, катехоламины, аргинин) [5]. СУА оценивали по способности СОД ингибировать процесс восстановления нитросинего тетразолия при генерации O_2^\bullet [6].

Активность каталазы определяли по способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена окрашенный комплекс [7].

Содержание общего белка определяли по Lowry [8]. В связи с

возможным изменением содержания воды в слюне при эмоциональном напряжении, активность ферментов рассчитывали не только на объем, но и на содержание белка.

Полученные результаты статистически обрабатывали с помощью ранговых критериев Вилкоксона Т для зависимых и U для независимых выборок и рангового коэффициента корреляции Спирмена [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При сопоставлении результатов в контрольной группе (табл.1) необходимо отметить более высокий уровень светосуммы ХЛ в H_2O_2 -люминол зависимой системе для слюны по сравнению с плазмой крови и обратное отношение для светосуммы Fe^{2+} -родамин активируемой ХЛ, что, видимо, связано с разными формами свободных радикалов, регистрируемых этими методами. Высота быстрой вспышки Fe^{2+} -родамин ХЛ была несколько выше в слюне, тогда как высота медленной вспышки в плазме крови почти в три раза превышала значения для слюны.

Активность каталазы в расчете на объем биологических жидкостей была значительно ниже в слюне при обратном соотношении, выраженном в единицах активности на грамм белка. Уровень СУА в слюне как в расчете на объем, так и на 1 г белка был значительно выше в слюне, чем в плазме крови. В последнем случае показатель имел отрицательный знак, что свидетельствует о дополнительной генерации супероксидных радикалов в пробах, содержащих плазму крови по сравнению с контрольными вариантами, в которых биологический материал отсутствовал. Очевидно, что в использованном нами методе [6], СУА отражает баланс между продуцирующими и устраняющими супероксидный радикал процессами. Необходимо отметить, что в крови основная мощность в элиминации супероксида принадлежит эритроцитарной СОД.

Таблица 1. Интенсивность СРП и активность АО систем в плазме крови и слюне практически здоровых людей в норме и при физиологическом эмоциональном напряжении

Исследуемые показатели	Нормальное состояние (контроль)		Эмоциональное напряжение (экзамен)	
	плазма	слюна	плазма	слюна
H_2O_2 -люминол ХЛ, усл. ед. светосуммы за 500 с	32645±2487	41010±1938	35074±2677	33765±4233
Fe^{2+} -родамин ХЛ:				
- светосумма, усл.ед.	68234±2171	38403±2065	67068±4400	28273±1679**
- высота быстрой вспышки, мм	179,9±5,8	202,5±11,6	168,4±6,8	166,6±11,8**
- высота медленной вспышки, мм	16,8±1,4	5,6±0,8	17,7±0,9	7,2±0,5*
МДА, мкМ	3,54±0,24	2,02±0,25	3,14±0,22*	1,36±0,13*
СУА, ед/с л	-26,03±1,25	2,94±0,63	-25,83±1,20	6,30±0,83**
ед/с г белка	-0,32±0,02	1,10±0,26	-0,30±0,01	1,98±0,25**
Каталаза, М/с л	0,37±0,03	0,04±0,01	0,49±0,07*	0,13±0,02**
мМ/с г белка	4,55±0,40	14,32±2,78	5,79±0,76	39,65±6,79**

Примечание. В таблицах * - достоверность отличий по отношению к контролю, где * - $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$.

Как следует из таблицы 1, в плазме крови доноров при физиологическом эмоциональной напряжении (экзамен) наблюдается уменьшение содержания вторичного продукта ПОЛ - МДА на 11%, что может являться результатом

активации системы антиоксидантной защиты, в частности, обнаруженного нами повышения активности каталазы на 32 % (в расчете на объем слюны).

Таблица 2. Интенсивность СРП и активность АО систем в плазме крови и слюне депрессивных больных до и после лечения

Исследуемые показатели	До лечения		После лечения	
	плазма	слюна	плазма	слюна
H ₂ O ₂ -люминол ХЛ, усл. ед. светосуммы за 500 с	30229±2348	30446±2628*	26362±2076	29666±2379
Fe ²⁺ -родамиң ХЛ:				
- светосумма, усл.ед.	82959±3708**	40540±2812	72573±4912*	30006±3001**
- высота быстрой вспышки, мм	213,6±10,3**	175,0±14,9*	211,9±9,7	157,8±14,2*
- высота медленной вспышки, мм	13,0±1,0*	6,6±0,7**	17,2±0,8**	5,8±0,6*
МДА, мкМ	3,74±0,19	3,04±0,33**	3,86±0,26	2,62±0,20
СУА, ед/с л	-50,93±4,62**	5,35±0,62**	-35,11±2,84*	3,14±0,37**
ед/с г белка	-0,61±0,05**	1,42±0,20*	-0,43±0,04*	0,82±0,10**
Каталаза, М/с л	0,65±0,07**	0,08±0,01*	0,44±0,04*	0,06±0,01*
мМ/с г белка	7,78±0,87**	22,69±3,03*	5,32±0,44**	15,54±2,12*

Примечание. В группе больных после лечения достоверность отличий (*) указана относительно группы больных до лечения.

При этом же эмоциональном состоянии в слюне происходили более выраженные изменения. Так, обнаружено снижение высоты быстрой вспышки Fe²⁺-родамиң активируемой ХЛ, отражающей содержание в системе гидроперекисей, на 18 %. Высота медленной вспышки Fe²⁺-индуцируемой ХЛ в присутствии активатора свечения – родамиңа, характеризующая наличие в системе субстрата окисления, увеличилась в 1,3 раза.

В условиях стресса, вызванного экзаменационной обстановкой, в слюне также происходило достоверное снижение на 33 % содержания МДА (табл.1).

При развитии эмоционального напряжения происходила мобилизация защитных механизмов и активация антистрессорных систем.

Нами обнаружено значительное повышение в слюне активности основных АО систем. Показано возрастание СУА на 114 % и активности каталазы на 197 % (в расчете на объем слюны) (табл.1). Можно предположить, что увеличение активности АО систем в слюне людей при физиологическом эмоциональном напряжении происходит за счет включения одного или нескольких механизмов: реакций биосинтеза антиоксидантных соединений в слюнных железах, влияния катехоламинов или глюкокортикоидов.

Наличие статистически достоверной корреляционной связи плазма-слюна (табл. 3) у практически здоровых доноров может быть обусловлено действием единой системы регуляции, особенно ее гормонального звена. Имеются литературные данные о том, что эмоциональный стресс, вызванный сдачей экзамена, сопровождается значительным изменением уровня ряда гормонов (катехоламинов, АКТГ, кортизола, альдостерона, ТТГ, Т₃, Т₄ и других) и биоактивных соединений (ренина, глюкозы, цАМФ, простагландинов) в крови у студентов [10].

Полученные нами данные свидетельствуют о большей информативности определения показателей активности СРП и антиоксидантных систем в слюне по сравнению с плазмой крови.

Таблица 3. Коэффициент корреляции рангов Спирмена плазма-слюна людей при разном эмоциональном состоянии

Исследуемые показатели	Практически здоровые люди		Депрессивные больные	
	контроль	экзамен	до лечения	после лечения
H ₂ O ₂ -люминол ХЛ	0,01	0,21	-0,24	-0,29
Fe ²⁺ -родамин ХЛ:				
- светосумма	0,04	0,81**	0,10	0,46*
- высота быстрой вспышки	0,60*	0,86**	0,54**	0,49*
- высота медлен. вспышки	0,59*	0,84**	0,48*	0,50*
МДА	0,63*	0,22	0,13	0,43*
СУА	-0,69*	0,44	-0,48*	-0,51*
Каталаза	0,41	-0,54	0,40	0,10

При длительном эмоциональном напряжении, имеющем патологический характер (депрессия), мы обнаружили более выраженные изменения СРП и их регуляторов, особенно в плазме крови.

В плазме крови депрессивных больных до начала курса лечения наблюдалось усиление интенсивности ХЛ, индуцированной Fe²⁺ в присутствии родамина 6 Ж, за счет увеличения светосуммы на 22 % и величины быстрой вспышки на 19 %. Количество субстрата окисления в системе уменьшилось в плазме крови больных до лечения на 23 % по отношению к практически здоровым донорам (табл.2).

Возможно, повышенный уровень свободных радикалов является следствием снижения СУА в плазме крови на 96 %, о чем говорит возрастание ее отрицательных значений. О напряжении АО систем свидетельствует усиление активности каталазы в плазме крови больных до лечения на 73 % (в расчете на объем слюны) (табл.2).

У депрессивных больных до лечения в слюне обнаружено ингибирование СРП, о чем свидетельствовало уменьшение светосуммы H₂O₂-люминол-зависимой ХЛ на 26 % и уменьшение величины быстрой вспышки Fe²⁺-родамин активируемой ХЛ на 14 %. Однако нами обнаружено увеличение высоты медленной вспышки ХЛ на 18 % (табл.2).

В слюне депрессивных больных до начала лечения наблюдалось повышение вторичного продукта ПОЛ - МДА на 50 %.

Работа АО систем слюны больных депрессивными расстройствами до проведения курса лечения характеризовалась повышением активности каталазы на 91 % и СУА на 82 %.

Как следует из представленных данных, у депрессивных больных до начала лечения наблюдалось одновременное повышение уровня свободных радикалов в плазме крови и усиление работы антирадикальных систем в слюне, что подтверждается наличием корреляционных связей (табл.3).

После проведенного курса лечения наблюдалась стабилизация некоторых изученных нами показателей в плазме крови и слюне больных.

Так, в плазме крови отмечено уменьшение интенсивности светосуммы Fe²⁺-индуцируемой ХЛ в присутствии активатора свечения родамина 6 Ж – на 13 %, увеличение высоты медленной вспышки ХЛ в этой же системе на 32 %, а также повышение СУА на 31 % и снижение активности каталазы на 32 % по сравнению с данными до лечения.

При анализе исследуемых показателей в слюне депрессивных пациентов

после лечения отмечено уменьшение величины кинетических параметров Fe^{2+} -родамин активируемой ХЛ (светосуммы, высот быстрой и медленной вспышек) и снижение активности работы АО систем.

После проведенного курса лечения в плазме крови депрессивных пациентов сохранялось повышение величины быстрой вспышки Fe^{2+} -родамин индуцированной ХЛ и снижение СУА по отношению к практически здоровым донорам, в то время, как в слюне происходило ингибирование интенсивности ХЛ в обеих изученных системах по сравнению с группой практически здоровых доноров.

Несмотря на то, что содержание МДА в слюне больных при выписке оставалось повышено на 30 % по сравнению с донорами появилась положительная корреляционная зависимость между уровнем МДА в плазме крови и слюне, имевшая место у контрольной группы (табл.3).

Таким образом, результаты исследований показывают глубину нарушений СРП и активности АО защиты при физиологическом эмоциональном напряжении и при депрессивных расстройствах. Представленные данные свидетельствуют о возрастании уровня генерации свободных радикалов в плазме крови и антиоксидантного потенциала в слюне человека при депрессии. Наличие статистически достоверных корреляций плазма-слюна исследуемых показателей позволяют предположить наличие общих механизмов регуляции. Полученные результаты свидетельствуют не только об эффективности исследования слюны для изучения СРП при разных эмоциональных напряжениях, но и о перспективности использования слюны для оценки эффективности проводимой терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В.А. (1991) Успехи современной биологии. **111**, 923-931.
2. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. (1979) Вopr. мед. химии. **23**, 132-137.
3. Шерстнев М.П., Атанаев Т.Б., Владимиров Ю.А. (1989) Биофизика. **34**, 684-687.
4. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. (1977) Современные методы в биохимии. - Медицина. Москва.
5. Гуляева Н.В., Левишина И.П., Обидин А.Б. и др. (1988) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. **46**, 159-160.
6. Fried R. (1975) Biochemistry. **57**, 657-660.
7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988). Лабораторное дело. **1**, 16-19.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem. **193**, 265-275.
9. Лакин Г.Ф. (1990) Биометрия. - Высшая школа. - Москва.
10. Тигранян Р.А. (1990) Гормонально-метаболический статус организма при экстремальных воздействиях. - Наука. - Москва.

Поступила 17.07.99.

**FREE RADICAL PROCESS INTENSITY AND ANTIOXIDANT ENZYME
ACTIVITIES IN HUMAN SALIVA AND BLOOD PLASMA
UNDER EMOTIONAL STRAIN**

A.I. LUKASH, V.G. ZAIKA*, N.P. MILUTINA, A.O. KUCHERENKO

Rostov State University, 344006, Rostov-on-Don, st. Bolshaja Sadovaja, 105

*Rostov State Medical University, 344022

Rostov-on-Don, by-st. Nakhichevanski, 31b

The intensity of free radical processes (FRP) and the activity of antioxidant (AO) systems in human blood plasma and saliva were studied under physiological emotional strain and depressive pathologies (before and after treatment). The significant alterations in the dynamics of investigative indexes under different emotional strain were revealed. These alterations in saliva were more intensive than in blood plasma. The treatment led to the stabilization of FRP intensity and the activity of AO protection. The correlation between saliva and blood plasma parameters allows to use saliva for the estimation of emotional strain and of the efficiency of therapeutics under depressive pathologies.

Key words: emotional strain, depressive pathologies, free radical processes, antioxidant system, saliva, plasma.