

чувствительностью к окислительному стрессу, что связано с особенностью их химического строения и метаболизма. Повышенная чувствительность мозговой ткани обусловлена высокой степенью насыщения кислородом (1/5 от общего количества кислорода в организме), преобладанием полиненасыщенных жирных кислот, присутствием “активной формы” железа и низкой активностью отдельных звеньев ферментативной антиоксидантной (АОЗ), в частности, каталазы [1-3]. При патологических состояниях в мозговой ткани создаются условия для интенсивной генерации радикальных продуктов, повышения окислительной деструкции белков, липидов, что приводит к нарушению структуры и функции клеточных мембран [4-8]. Интенсификация процессов окислительной модификации компонентов клеточной мембраны мозга может являться причиной изменений, связанных со способностью мембран генерировать, проводить и воспроизводить нервный импульс, нарушением рецепторных, медиаторных и энергетических систем. Возможно, это является одним из патогенетических звеньев развития психических расстройств у больных. Нами были проанализированы интенсивность окислительной деструкции белков плазмы крови (спонтанной и металл-катализируемой) у больных с психическими нарушениями (депрессия, деперсонализация). Для этих заболеваний характерно нарушение функциональной активности в опиоидной и кортикостероидной системах [9]. Непосредственный контроль за изменением опиоидной системы и состоянием опиоидных рецепторов в мозговой ткани человека крайне затруднен. Однако хорошо известно, что у больных с депрессией наблюдаются нарушения в гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной системе (ГТАКС) [10, 11]. Исходя из этого, мы использовали нейроэндокринные показатели для косвенной оценки состояния эндорфиновой системы у больных. С этой целью проводилось исследование уровня кортикостероидов плазмы крови и параллельно прослеживалась возможная связь между характерными для данного психического заболевания изменениями гормонального спектра и свободно-радикальными процессами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Обследовано 11 человек, страдающих депрессией, в возрасте от 19 до 40 лет, из них 7 женщин и 4 мужчин. Длительность заболевания - около года. С синдромом деперсонализации обследовано 7 человек в возрасте от 22 до 47 лет, из них 4 женщины и 3 мужчин. Длительность заболевания от 1 года до 5 лет. Сравнение проводили с группой практически здоровых людей в возрасте от 20 до 48 лет.

Забор крови у обследуемых больных осуществляли в утреннее время натощак. В качестве антикоагулянта использовали раствор гепарина. В плазме крови определяли степень спонтанного и металл-катализируемого окисления (МКО) белков по методу Левина [12] в нашей модификации [13]. Метод оценки окислительной модификации белков основан на реакции взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов. Для инициации окислительной модификации белков использовали среду Фентона: 0,1 М фосфатный буфер (рН 7,4), Fe^{+2} (10^{-3} М), ЭДТА (10^{-3} М) комплекс, который готовили *ex tempore*, и H_2O_2 (3×10^{-4} М) [14]. Для регистрации окислительной модификации белков проводили предварительно их осаждение с помощью 20% раствора ТХУ. К денатурированным белкам приливали 1,0 мл 0,1 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl . Инкубацию осуществляли при комнатной температуре

в течение 1 часа, затем пробы центрифугировали при 3000 g в течение 20 минут. Осадок промывали 3 раза смесью этанол : этилацетат (1:1) для экстракции липидов и 2,4-ДНФГ, который не прореагировал с карбонильными группами окисленных белков. Полученный осадок высушивали для удаления растворителей и затем растворяли в 8 М мочеvine. Мочевину приливали к осадку в объеме 3,0 мл. Для лучшего растворения осадка добавляли одну каплю 2 М HCl. Оптическую плотность образовавшихся динитрофенилгидразонов регистрировали на спектрофотометре СФ-46 при длинах волн 274 нм и 363 нм. Степень окислительной модификации белков выражали в единицах оптической плотности, отнесенных на 1 г белка или 1 мл плазмы.

Окислительную модификацию белков также оценивали по образованию битиразиновых сшивок при длине волны 415 нм (длина волны возбуждения - 325 нм) [15]. Измерения проводились на спектрофлуориметре Hitachi. В качестве системы, генерирующей активные формы кислорода (АФК), использовали среду Фентона, где в присутствии солей железа и H_2O_2 идет образование OH^\bullet . Контрольная проба содержала 0,95 мл фосфатного буфера (pH 7,4; 1/15 M) и 0,05 мл сыворотки. Опытная проба содержала 0,85 мл фосфатного буфера, 0,05 мл сыворотки, 0,05 мл смеси 1mM растворов ЭДТА и $FeSO_4$ (0,1mM) и 0,05 мл раствора H_2O_2 . Пробы инкубировали при 37°C в течение 2 и 24 часов. Перед измерением образцы разводили в 5 раз.

С целью оценки степени фрагментации окисленных белков плазмы крови использовали надосадочную жидкость, полученную после осаждения белков. К 0,05 мл плазмы, разбавленной физиологическим раствором в соотношении 1:10, добавляли при анализе спонтанной окислительной модификации белков 0,1 М фосфатный буфер, а при анализе металл-катализируемой - среду Фентона. Общий объем пробы был 1,0 мл. После 15 минутной инкубации при 25°C окисленные белки осаждали 20% ТХУ и центрифугировали при 3000g. В надосадочной жидкости определяли кислоторастворимые пептиды в ультрафиолетовой области спектров при длинах волн 254, 272 и 280 нм [16].

Анализ структурных изменений окисленных белков осуществляли с использованием метода электрофоретического разделения в полиакриламидном геле (ПААГ). Электрофорез плазмы белков проводили по методу Laemmli [17] в градиенте ПААГ с додецилсульфатом натрия (ДДС-Na). Плазму крови обрабатывали трис-HCl буфером (0,125 М, pH 6,8), содержащим 2% ДДС-Na и 5% β -меркаптоэтанола с использованием установки "Mini-Protein" (Biorad).

Определение кортикостероидов (кортизола, кортизона, кортикостерона, 11-дезоксикортикостерона, 11-дезоксикортизола и тестостерона) в плазме крови осуществляли с помощью микроколоночной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием преформированного градиента ацетонитрила в воде и твердофазной экстракции в качестве подготовки проб [18].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 5,0 Windows (StatSoft, Inc. 1995).

РЕЗУЛЬТАТЫ. Известно, что в результате окислительной модификации белков наблюдается образование карбонильных производных, которые в присутствии 2,4-ДНФГ образуют 2,4-ДНФГгидразоны, регистрируемые при длине волны 363-370 нм [12]. Нами была произведена запись дифференциальных спектров поглощения 2,4-ДНФГгидразонов бычьего сывороточного альбумина

(Serva) после его инкубации в среде Фентона. В результате мы обнаружили дополнительный пик при длине волны 270-274 нм. Возможно, мы регистрируем алифатические альдегиды основных аминокислотных остатков [19]. При анализе спонтанной окислительной деструкции белков плазмы крови больных с депрессивным синдромом было обнаружено статистически достоверное повышение уровня 2,4-ДНФгидразонов только при длине волны 270 нм (табл.1). У пациентов с синдромом деперсонализации на этой длине волны наблюдается тенденция к повышению интенсивности окислительной модификации белков (21%). Во всех обследованных группах больных не было выявлено никаких различий в уровне 2,4-ДНФгидразонов белков плазмы крови при общепринятой длине волны - 363 нм.

Статистически достоверные изменения при обеих длинах волн выявлены при анализе МКО белков плазмы крови у пациентов с депрессией. У пациентов с синдромом деперсонализации различия достоверны только при длине волны 363 нм.

Таблица 1. Окислительная модификация белков плазмы крови у пациентов с психическими расстройствами

Группы обследуемых людей	Спонтанная окислительная модификация белков				Металл-катализируемая окислительная модификация белков			
	270 нм		363 нм		270 нм		363 нм	
	на 1 мл плазмы	на 1 мг белка	на 1 мл плазмы	на 1 мг белка	на 1 мл плазмы	на 1 мг белка	на 1 мл плазмы	на 1 мг белка
1. Здоровые (n=16)	4,08 ±0,13	55,50 ±1,92	6,04 ±0,21	83,60 ±3,26	35,10 ±1,85	478,00 ±28,70	35,40 ±0,58	489,00 ±9,90
2. Синдром деперсонализации (n=5)	4,84 ±0,45	67,30 ±6,52	5,88 ±0,35	81,80 ±5,57	39,30 ±2,61	545,00 ±36,40	40,20 ±0,98	558,00 ±16,70
3. депрессивный синдром (n=8)	6,05 ±0,18	83,40 ±3,28	6,62 ±0,42	87,90 ±5,41	41,20 ±1,17	565,00 ±9,40	41,00 ±1,60	563,00 ±15,20
P ₁₋₂	<0,05				<0,05			
P ₁₋₃					<0,05			

Образование битирозина происходит с разной интенсивностью у обследованных больных. Через 2 часа инкубации плазмы крови с системой Фентона у пациентов с синдромом деперсонализации наблюдается повышение уровня битирозиновых сшивок на 227%, а у пациентов с депрессией - только на 141% по сравнению с контрольными пробами без реактива Фентона. Через 24 часа инкубации у больных с деперсонализацией уровень битирозина возрастает до 361%, а при депрессии отмечается тенденция к снижению по сравнению со здоровыми людьми (рис.1).

Окислительная модификация белков связана с изменением их структурной организации, сопровождающейся фрагментацией с образованием низкомолекулярных компонентов, либо агрегацией белковых молекул [20]. Проведенный нами анализ надосадочной жидкости позволил выявить повышение уровня продуктов фрагментации белков за счет МКО по сравнению со спонтанной окислительной деструкцией белков плазмы крови у всех обследованных людей (табл.2). Нами были обнаружены статистически

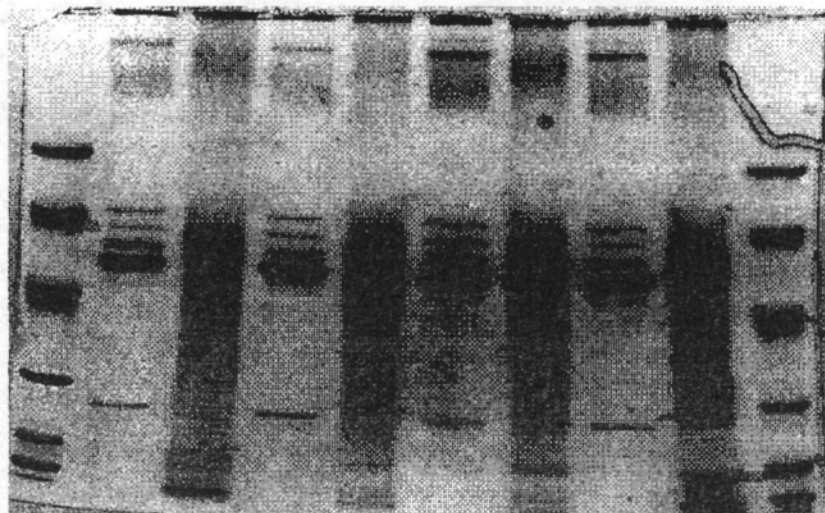


Рисунок 2.

Электрофорез белков плазмы крови здоровых людей и больных с нарушениями психики (депрессия, деперсонализация).

Таблица 2. Степень фрагментации окисленных белков плазмы крови у пациентов с психическими расстройствами

Группы обследуемых людей	Спонтанное окисление *			Металл-катализируемое окисление*		
	254 нм	270 нм	280 нм	254 нм	270 нм	280 нм
1. Здоровые (n = 16)	1,600 ±0,015	0,171 ±0,004	0,075 ±0,009	1,830 ±0,011	0,356 ±0,006	0,201 ±0,003
2. Синдром деперсонализации (n = 5)	1,670 ±0,021	0,203 ±0,013	0,097 ±0,001	1,880 ±0,012	0,381 ±0,009	0,233 ±0,008
3. Депрессивный синдром (n = 8)	1,610 ±0,009	0,191 ±0,006	0,087 ±0,004	1,840 ±0,010	0,375 ±0,004	0,219 ±0,002
P ₁₋₂	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	<0,02
P ₁₋₃		<0,05	<0,05		<0,05	<0,005
P ₂₋₃	<0,05			<0,01		

*- Достоверные различия между металл-катализируемым и спонтанным окислением белков плазмы крови во всех группах обследуемых людей ($p < 0,001$).

Было установлено, что из 6 определяемых показателей кортикостероидов (кортизол, кортизон, кортикостерон, 11-дезоксикортизол, 11-дезоксикортикостерон и тестостерон) наиболее информативными являются кортизол, кортизон и кортикостерон. У пациентов с синдромом деперсонализации обнаружено статистически достоверное снижение уровня кортизола и повышение кортикостерона. У больных с депрессией наблюдается статистически достоверное повышение уровня кортизола и снижение кортикостерона. На фоне высокого содержания кортизола не отмечается повышения его неактивного метаболита кортизона. Таким образом, у больных с изучаемыми нами психическими расстройствами выявлена разная направленность метаболизма кортикостероидов (рис.3). Содержание других кортикостероидов остается фактически одинаковым во всех обследованных группах людей.

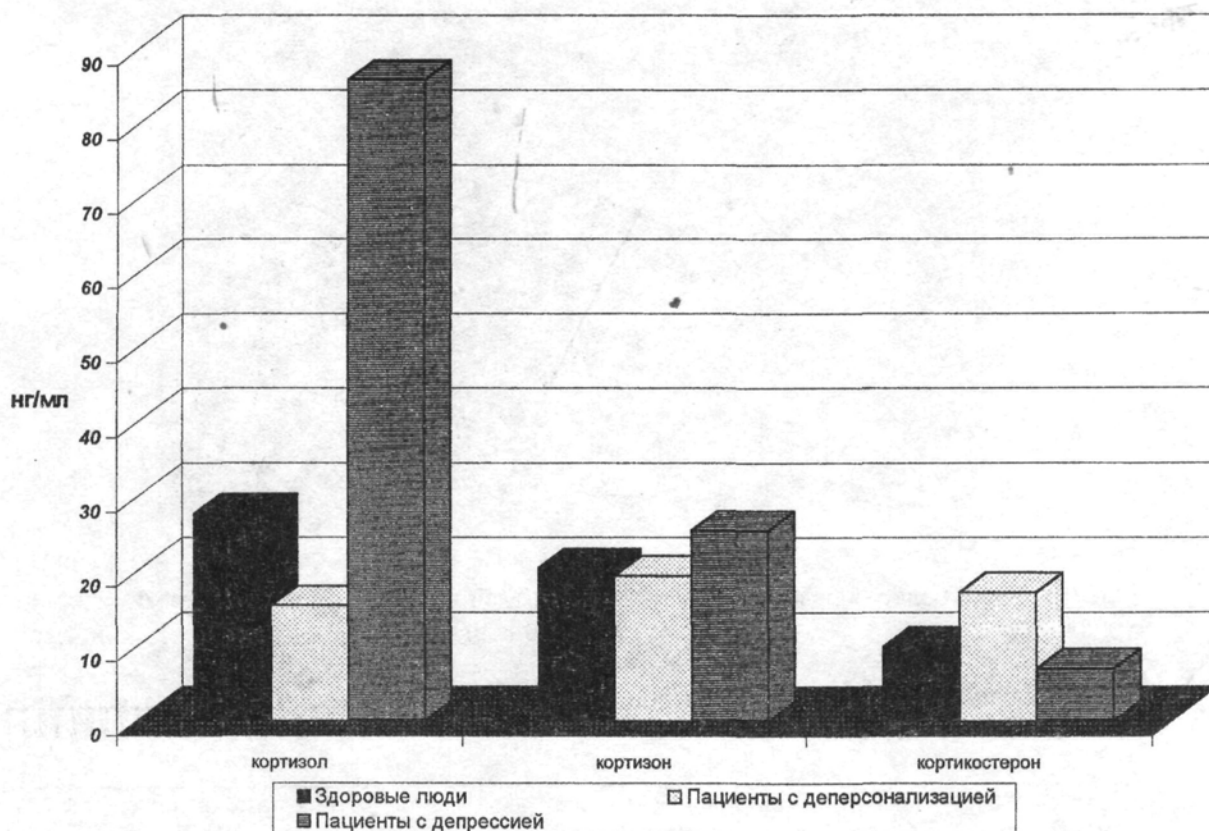


Рисунок 3.

Содержание кортикостероидов в плазме крови больных с расстройствами психики.

ОБСУЖДЕНИЕ. Известно, что депрессия характеризуется как состояние хронического стресса. В свою очередь деперсонализация развивается в ответ на резко выраженную стрессорную ситуацию чаще эмоционального характера, когда организм в качестве защитной реакции в ответ на мощное стрессорное воздействие использует "психическую анестезию". Это состояние характеризует переживания больного как притупление или отсутствие эмоций и чувственного компонента ощущений и восприятия внешнего мира [9]. В том и в другом случае мы имеем дело со стрессорной реакцией организма разной степени выраженности, которая сопровождается изменением гормонального статуса и развитием состояния окислительного стресса. Известно, что при стрессе создаются условия для интенсивной выработки свободно-радикальных продуктов. Именно они могут выполнять ключевую роль в развитии нарушений со стороны ГГКС, серотонинергической и симпатoadренергической систем. Причиной этих изменений может быть окислительная деструкция компонентов клеточных мембран и соответственно рецепторного аппарата или нарушение метаболизма самих гормонов и нейротрансмиттеров, вызванное усилением свободно-радикальных процессов.

Нарушение структуры клеточных мембран и изменение функциональной активности рецепторного аппарата за счет свободно-радикальных продуктов в первую очередь связано с окислительной деструкцией белков и липидов. Выявленное нами повышение интенсивности окислительной модификации белков

плазмы крови исследуемых больных фактически отражает общую направленность свободно-радикальных процессов и, в частности, окисления белков во всем организме, в том числе в мозговой ткани. Учитывая большую и очень разнообразную функциональную нагрузку белков в тканях, их окислительная модификация может носить в отличие от перекисидации липидов более избирательный и специфический характер при различных патологических состояниях.

Проведенный нами сравнительный анализ спонтанного окисления и МКО по уровню карбонильных производных, образованию битирозиновых сшивок, степени выраженности фрагментации, по результатам электрофоретического разделения окисленных белков и уровню кислоторастворимых пептидов показал четкие различия между здоровыми людьми и больными с депрессивным и деперсонализационным синдромами. Не исключено, что в зависимости от характера психических нарушений окислительной деструкции подвергаются разные белки.

Специфические нарушения в метаболизме кортикостероидов, возможно, связаны с избирательной окислительной модификацией белков. Высокий уровень кортизола в плазме крови больных с депрессией может быть обусловлен окислительной деструкцией белков рецепторного аппарата клеток. Известно, что именно состояние рецепторов кортикостероидов играет ключевую роль в развитии депрессии [21]. Повышение уровня кортизола может быть также вызвано нарушением превращения его в неактивный кортизон за счет снижения активности цитохромом P450, 11- β -гидроксилазы при состояниях окислительного стресса.

С другой стороны, анализ содержания кортикостероидов позволяет сделать вывод о нарушении в процессе стероидогенеза и сдвиге его в сторону синтеза глюкокортикоидов. Во-первых, снижен уровень кортикостерона; во-вторых, отсутствует повышение содержания кортизона на фоне высокого содержания кортизола. Известно, что у глюкокортикоидов и минералокортикоидов имеются общие рецепторы, поэтому интенсивное превращение кортизола в неактивный кортизон обеспечивает в норме сохранение рецепторного аппарата для минералокортикоидов [22].

Секреция кортикостероидов непосредственно связана с эндорфиновой системой, снижение функциональной активности которой выявлено у депрессивных больных [23]. Существует мнение, что причиной снижения активности опиоидной системы может быть дисфункция ее рецепторного аппарата [24-27], возможно, обусловленная окислительной модификацией белков. Не исключено, что в условиях окислительного стресса у депрессивных больных более интенсивно окислительной деструкции подвергаются сами нейропептиды и нуклеиновые кислоты, кодирующие рецепторные белки. Показано, что лечение крыс антидепрессантами приводит к повышению содержания мРНК белков рецепторного аппарата кортикостероидов и увеличению их рецепторносвязывающей способности [28].

В условиях окислительного стресса, если он носит затяжной характер, усиливается протеолитический распад окисленных белков и нейропептидов. Косвенным подтверждением этого предположения является обнаруженный нами более низкий процент образования битирозиновых сшивок у больных с депрессией по сравнению с пациентами с деперсонализацией. По данным

3. Левадная О.В., Донченко Г.В., Валуцина В.М., Корж Е.В., Хиль Ю.Н. (1998). Укр. биох. журнал, **70**, (6), 53-58.
4. Гуляева Н.Б., Ерин А.Н. (1995). Нейрохимия, **12**, (2), 3-15.
5. Evans P.H. (1993). Brit. Med. Bull., **49**, №3, 557-587.
6. Yotz M.E., Kunig G., Riederer P., Youdim M.B.H. (1994). Pharmacol. Ther., **63**, 37-122.
7. Halliwell B. (1989). Acta Neurol. Scand., **126**, 23-33.
8. Федорова Т.Н., Болдырев А.А., Ганнушкина И.В. (1999). Биохимия, **64**, 94-98.
9. Нуллер Ю.Л., Морозова М.Г., Дубинина Е.Е., Кушнир О.Н., Гампер Н.Л. (1999). Обзорение психиатрии и медицинской психологии им. В.М.Бехтерева, №2, 56-59.
10. Nemeroff C.B., Widerlov G., Bissette G., Walleus H., Karlsson J., Eklund K., Kilts C.D., Loosen P.T. (1984). Science, **226**, 1342-1344.
11. Model S., Yassouridis A., Huber J., Holsboer F. (1997). Neuroendocrinology, **65**, 216-222.
12. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent J., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. (1990). Meth. Enzymol., **186**, 464-478.
13. Дубинина Е.Е., Бунмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов Г.Е. (1995). Вopr. мед. химии, **41**, №1, 24-26.
14. Halliwell B., Gutteridge M.C. (1990). Meth. Enzymol., **186**, 1-85.
15. Davies K.J.A. (1987). J. Biol. Chem., **262**, 9895-9901.
16. Wolff S.P., Dean R.T. (1986). Biochem. J., **234**, 399-403.
17. Laemmli U.K. (1970). Nature, **227**, 680-685.
18. Gamper N.L., Velicanova L.I., Korolyova H.M. (1996). In: Proc. Int. Symp. on Capillary Chromatography: Riva Del Garda. 1655-1663.
19. Jones L.A., Holmes J.C., Seligman R.B. (1956). Anal. Chem., **28**, 191-198.
20. Davies K.J.A., Delsignore M.E. (1987). J. Biol. Chem., **262**, 9908-9913.
21. Modell S., Yassouridis A., Huber J., Holsboer F. (1997). Neuroendocrinology, **65**, 216-222.
22. Stewart P.M., Krozowski Z.S. (1999). In: Vitamins and Hormones. Ed. by G. Litwack. Acad. Press. San Diego, London, Boston, N.Y., Sydney, Tokyo, Toronto, **57**, 249-324.
23. Gold M.S., Pottash A.L.C., Sweeney D., Martin D., Extein J. (1982). Ann. N.Y. Acad. Sci., 140-150.
24. Kline N.S., Li C.H., Lenmann H.E., Lajtha A., Laski E., Cooper T. (1977). Arch. Gen. Psychiatry, **43**, 1111-1113.
25. Snyder S.H. (1978). Am. J. Psychiatry, **135**, 645-652.
26. Gold M.S., Pottash A.L.C., Sweeney D.R., Kleber H.D., Redmond D.E. (1979). Am. J. Psychiatry, **136**, 982-983.
27. Extein J., Pottash A.L.C., Gold M.S. (1982). Anna. N.Y. Acad. Sci., 113-119.
28. Brady L.S., Gold P.W., Herkenham M., Lynn A.B., Whitfield H.J. (1992). Brain Res., **572**, 117-125.
29. Terman G.W., Liebskind J.C. (1986). Ann. N.Y. Acad. Sci., **467**, 300-308.
30. Филаретов Ф.А., Подвигина Т.Т., Филаретова Л.П. (1994). Адаптация как функция гипофизарно-адренкортикальной системы. Санкт-Петербург. Наука. с. 29-31.

31. Mac Lennan A.J., Drugan R.C., Hyson R.L., Maier S.F. (1982). Science, **215**, 1530-1532.
32. Kovacs G.L., Telegdy G., Lissak K. (1976). Psychoneuroendocrinology, **1**, 219.
33. Харченко Е.П., Соколова Т.В., Калихевич В.Н. и др. (1987). Докл.АН СССР, **297**, №5, 1264-1267.
34. Шестак К.П., Сергеева М.Г., Зайцев С.В., Харченко Е.П. и др. (1990). Укр. биохим. журнал, **62**, (2), 23-29.
35. Mesiano S., Coulter C.L., Jatte R.B. (1993). J.Clin.Endocrinology a. Metabolism. **77**, 1184-1189.
36. Dubinina E.E., Nuller J.L., Morozova M.G., Kovrugina S.V., Gamper N.L. et all. (1998). J.Neurochem., **71**, (Suppl.) 1, 23.

Поступила 10.12.1999.

OXIDATIVE MODIFICATION BLOOD PLASMA PROTEINS IN PATIENTS WITH MENTAL DISORDERS (DEPRESSION AND DEPERSONALIZATION)

E.E.DUBININA, M.G.MOROZOVA, N.V.LEONOVA, N.L.GAMPER, I.B.SOLITERNOVA,
JU.L.NULLER, G.B.BUTOMA, S.V.KOVRUGINA.

Department of Biochemistry, Psychoneurological Bekhterev Institute
Bekhterev Str. 3, St.Petersburg 193019 Russia; tel.: 567-90-79, fax: 567-79-27.

We determined the oxidative modification of proteins (spontaneous and metal-catalysing oxidation, MKO) and the level of corticosteroids in patients with the depersonalization and depression. For detecting oxidative modification of plasma proteins we measured the concentration of protein carbonyl groups formed with 2,4-dinitrophenylhydrazine 2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives; the formation of dityrosine by fluorescence method; protein aggregation and fragmentation. Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE in the presence β -mercaptoethanol was used to determine the aggregation or fragmentation of proteins by oxygen radicals (OH^\bullet). Acid-soluble peptides were analysed as products of the fragmentation oxidative modification proteins.

The level of the corticosteroids was determined using HPLS.

The increase of the concentration of protein carbonyl groups in blood plasma of patients with mental disorders. In patients with depersonalization we determined the increase of the bityrosyl cross-link, and different degrees of fragmentation compared with depressive patients.

The cortisol level was decreased and corticosterone was increased in the blood plasma of patients with depersonalization. In depressive patients the cortisol level was increased and corticosterone was decreased as is discussed.

We discussed the role oxidative modification proteins in the disturbance of the corticosteroid and opioid receptors functions in the patients with mental disorders.

Key words: oxidative modification proteins, dityrosine, oxidative stress, corticosteroids, depression, depersonalization.