

УДК 577.151

©Коллектив авторов

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАСПАЗ В ЛИМФОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ С ДЕПРЕССИЕЙ И ТРЕВОГОЙ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

А.А. Яковлев^{1,2*}, Т.А. Дружкова², М.Н. Гришкина², А.Б. Гехт^{2,3}, Н.В. Гуляева^{1,2}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485, Москва, ул. Бултерова, д. 5А; эл. почта: al_yakovlev@rambler.ru

²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьёва,
115419, Москва, ул. Донская, д.43

³Российский научно-исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Пограничные психические расстройства (ППР) входят в число самых распространенных психических заболеваний, однако патогенез этих заболеваний остается не до конца выясненным. Согласно данным литературы и нашим предыдущим исследованиям, патологические изменения при ППР могут затрагивать не только клетки головного мозга, но и клетки иммунной системы. Одной из функционально значимых примеров связи иммунной и нервной систем при ППР является гибель лимфоцитов, выявленная, в частности, при наиболее часто встречающемся психическом расстройстве - депрессии. Ранее нами было показано, что активность каспаз, основных ферментов программированной клеточной гибели, повышается при некоторых типах ППР. В данной работе мы исследовали активности каспаз в мононуклеарах крови (МНК) пациентов с ППР разной тяжести. Было обнаружено, что при тяжелой форме депрессивного расстройства активность инициаторных и исполнительных каспаз понижается как по сравнению с контролем, так и по сравнению с пациентами с более легкой формой депрессивного расстройства. Напротив, при тяжелой форме тревожного расстройства активность тех же ферментов повышена как относительно контроля, так и относительно пациентов с более легкой формой тревожного расстройства. Таким образом, исследование активности каспаз в МНК позволяет не только различать тяжелые и легкие формы ППР, но и поможет в будущем выявить конкретные молекулярные механизмы развития депрессии и тревоги.

Ключевые слова: депрессия, тревога, лимфоциты, апоптоз, каспазы, пограничные психические расстройства

DOI 10.18097/PBMC20166205588

ВВЕДЕНИЕ

Понятие “пограничные психические расстройства” (ППР) используется для обозначения нерезко выраженных нарушений, граничащих с состоянием здоровья и отделяющих его от собственно патологических психических проявлений, сопровождающихся значительными отклонениями от нормы [1]. Механизмы развития ППР во многом неизвестны, хотя выдвинуты некоторые предположения, объясняющие возникновение и развитие этих заболеваний [2, 3].

Наряду с изучением механизмов развития психических патологий, отдельный практический интерес представляет собой идентификация маркеров этих состояний [4]. Поиск маркеров целесообразнее всего проводить в крови, так как показано, что в клетках головного мозга (нейронах и глии) и в клетках периферической крови целый ряд процессов развивается сходным образом: экспрессия генов, рецепция низкомолекулярных регуляторов, интенсивность процессов метаболизма [5]. Важно отметить, что клетки крови могут быть не только источником маркеров ППР, но и могут принимать участие в развитии ППР [3].

Протекание депрессивного расстройства, самого распространенного ППР, сопровождается изменениями в иммунной системе пациента,

в первую очередь, гибелью иммунных клеток [3, 6, 7]. Однако механизм клеточной гибели в этой ситуации до сих пор не установлен. В частности, неизвестно, является ли этот процесс каспазо-зависимым. Ранее мы показали, что при некоторых типах ППР активность каспаз в мононуклеарных клетках (МНК) пациентов может изменяться [8]. Логическим продолжением работы стала проверка гипотезы о различном вовлечении каспаз в программированную гибель клеток иммунной системы при ППР разной степени тяжести. Для этого мы определили активность этих ферментов в МНК у пациентов с такими расстройствами.

МЕТОДИКА

Сбор материала для исследования

В работе использовали образцы крови пациентов НПЦ психоневрологии в возрасте от 19 до 83 лет (квартили 0,25-0,75 42-61 год) женского пола; в качестве контроля была использована группа добровольцев женского пола сходного с пациентами возраста без психических отклонений от нормы. Кровь отбирали при поступлении пациентов в стационар НПЦ психоневрологии. От всех участников эксперимента было получено информированное согласие на использование их биологического материала для исследования.

Все пациенты прошли клиническое обследование врачом-психиатром как при поступлении в стационар, так и при выписке из стационара после прохождения пациентом курса лечения. Все диагнозы устанавливали в соответствии с диагностическими критериями МКБ 10. В исследование вошли пациенты, у которых при клиническом осмотре врачом-психиатром определялся депрессивный или тревожный ведущий синдром. Депрессивный синдром характеризовался преобладанием грусти, печали, тоски, сниженного настроения, апатии, нарушения сна, ангедонии в клинической картине. При ведущем тревожном синдроме на первое место выступали тревога, волнение, чувство беспокойства, у некоторых сопровождающиеся учащённым сердцебиением и психомоторным возбуждением. Этим пациентам были поставлены следующие диагнозы: расстройство личности органической этиологии, смешанное тревожное и депрессивное расстройство, депрессивный эпизод и рекуррентное депрессивное расстройство. Психологическое обследование включало заполнение больными шкалы депрессии Бека, опросника по выявлению личностной и ситуационной тревоги Спилбергера, оценку депрессии по шкале Гамильтона. Все исследуемые пациенты были осмотрены терапевтом и неврологом с целью исключения тяжёлой соматической и неврологической патологии. В контрольную группу включены 36 человек, в группу пациентов с ведущим синдромом депрессия – 32 человека, в группу пациентов с ведущим симптомом тревога – 38 человек.

Обработка образцов крови

Кровь собирали в пробирки с ЭДТА в качестве антикоагулянта и хранили не дольше 2 ч до обработки. На 3 мл раствора Histopaque-1077 комнатной температуры наслаивали 2 мл крови и центрифугировали при 400 g в течение 30 мин. Отбирали верхний слой, содержащий плазму, и непрозрачный слой на границе раздела фаз, содержащий фракцию МНК (лимфоциты и моноциты). Плазму центрифугировали при 400 g 10 мин и отбирали супернатант. Фракцию, содержащую клетки крови, отмывали в 10 мл фосфатно-солевого буфера, центрифугировали при 250 g 10 мин. Повторяли отмывку в 0,5 мл фосфатно-солевого буфера, центрифугировали при 250 g 10 мин, супернатант отбрасывали. Все полученные пробы замораживали и хранили при -80°C.

Определение активности протеаз

Клетки лизировали в буфере для лизиса (20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ, 0,5 mM ЭДТА, 1 mM ФСМФ, 0,05% NP-40) при 4°C в течение 15 мин. После центрифугирования (13000 g, 15 мин, 4°C) отбирали супернатант и измеряли активность протеаз, используя специфические флуорогенные субстраты (100 мкМ): Ac-VDVAD-AMC для каспазы-2, Ac-DEVD-AMC для каспазы-3, Ac-IETD-AMC для каспазы-8, Ac-VEHD-AMC для каспазы-9. Калибровочную

кривую строили по AMC (7-амино-4-метилкумарину). Пробы инкубировали с субстратом в реакционном буфере (20 mM HEPES, 10 mM ДТТ, 1 mM ЭДТА, pH 7,5) в течение 60 мин при 37°C, регистрируя значения флуоресценции через каждые 10 мин при длинах волн возбуждения и флуоресценции 370 и 440 нм, соответственно. Активность выражали в пкмоль субстрата, расщеплённого в минуту одним мг белка.

Определение концентрации белка

Концентрацию белка в полученных лизатах клеток определяли по связыванию с ортофталевым альдегидом, измеряя интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания 370 и 460 нм соответственно. В качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc. Различия между группами определяли с помощью непараметрического теста Манна-Уитни, данные представлены в виде $M \pm SD$. Для распределения пациентов на группы в зависимости от тяжести состояния (лёгкие и тяжёлые) использовали кластерный анализ. Для анализа динамики изменений в группах лёгких и тяжёлых пациентов использовали дисперсионный анализ (ANOVA) для зависимых переменных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами было установлено, что при поступлении в стационар некоторые группы пациентов ППР имеют повышенный уровень активности каспаз в МНК [8]. Однако, осталось невыясненным, связана ли повышенная активность каспаз в МНК с тяжестью патологии и с успешностью выздоровления. Мы предположили, что активность каспаз выражена более сильно в группе пациентов с более тяжёлым течением заболевания, поэтому для проверки этой гипотезы с помощью статистических методов провели разделение пациентов с ведущим депрессивным синдромом на группу “лёгких” и группу “тяжёлых” депрессивных пациентов, основываясь на оценке их состояния. Для разделения всех депрессивных пациентов на две группы, максимально различающиеся между собой по тяжести депрессии на основании полученных пациентами баллов по шкалам Бека и Гамильтона. Такой статистический подход позволил выделить две группы, условно названные “лёгкими” и “тяжёлыми” депрессивными пациентами.

Показатели тяжести депрессии в двух этих группах можно охарактеризовать следующим образом. “Лёгкие” пациенты характеризуются в среднем умеренной депрессией по шкале Бека (то есть по этой шкале их состояние оценивается в 19 ± 7 балла) при поступлении в стационар и отсутствием симптомов депрессии или легкой депрессией

(8 ± 4 балла по шкале Бека) после лечения. У “тяжёлых” пациентов отмечена тяжёлая степень депрессии (38 ± 8 балла по шкале Бека) при поступлении и умеренная депрессия (25 ± 7 баллов по шкале Бека) после прохождения курса лечения. По шкале Гамильтона, тем не менее, “лёгкие” и “тяжёлые” депрессивные пациенты не различаются, их различие обусловлено только оценкой депрессии по шкале Бека. Степень улучшения состояния с момента поступления в стационар до выписки из него не различается между “лёгкими” и “тяжёлыми” депрессивными пациентами по результатам дисперсионного анализа для зависимых переменных для оценки улучшения по шкале Бека ($F(1, 30) = 0,274, p=0,605$) и по шкале Гамильтона ($F(1, 30) = 0,348, p=0,560$). У депрессивных пациентов между группами “лёгких” и “тяжёлых” не было выявлено отличий по тревожности (данные не представлены). Таким образом, группы “лёгких” и “тяжёлых” пациентов отличаются только тяжестью симптомов депрессии до и после лечения.

Активности протеаз семейства каспаз в МНК различались между группами “лёгких” и “тяжёлых” депрессивных пациентов. Активности всех исследованных каспаз (каспазы-2, -3, -8 и -9) были ниже в группе “тяжёлых” пациентов по сравнению с контролем на 30-36% (рис. 1, 2), достигая уровня статистической значимости для каспаз-2, -3, и -8.

По этим показателям “лёгкие” пациенты не отличались от контрольной группы, но достоверно отличались от “тяжёлых” (каспазы-2, -3, -8; рис. 1, 2). Феномен снижения активности каспаз в МНК при ППР обнаружен впервые. Таким образом, на ранних этапах развития депрессии активность каспаз в МНК остаётся на уровне контроля, но затем, по мере развития депрессии и увеличения тяжести состояния, снижается. Можно предположить, что активность каспаз в МНК может служить определенного рода маркером, определяющим тяжесть депрессивного состояния.

Распределение пациентов на группы в соответствии с тяжестью симптомов было проведено нами и при исследовании пациентов с тревожным состоянием. При оценке тяжести этого состояния этих пациентов оценивали тревогу по шкалам личностной и ситуационной тревоги Спилберга. Кластерный анализ для тревожных пациентов выявил две группы, также условно названные нами “лёгкие” и “тяжёлые” пациенты. Согласно данным дисперсионного анализа, динамика улучшения между двумя этими группами не различалась ни для ситуативной тревоги ($F(1, 36) = 3,246, p=0,080$), ни для личностной ($F(1, 36) = 1,743, p=0,195$). Таким образом, группы “лёгких” и “тяжёлых” пациентов с ведущим синдромом тревожность различались между собой по тяжести симптомов тревоги как при поступлении, так и при выписке.

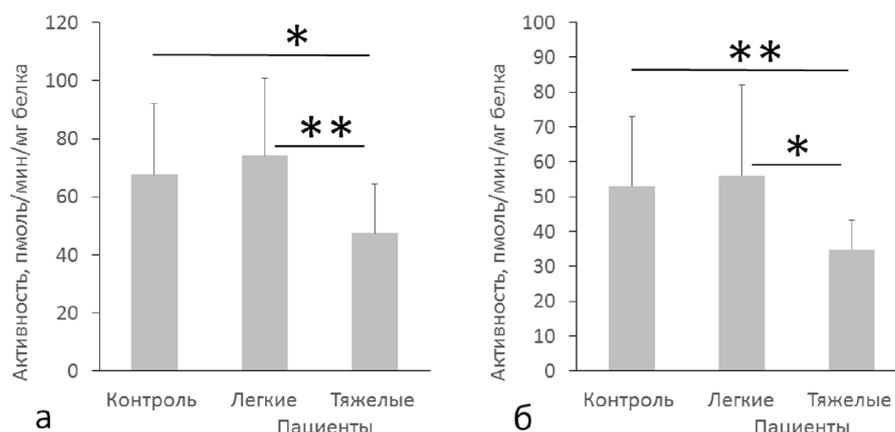


Рисунок 1. Активность протеаз, пмоль/мин/мг белка, в МНК “лёгких” и “тяжёлых” депрессивных пациентов, а также в контрольной группе; а) активность каспазы-2, б) активность каспазы-3. ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$.

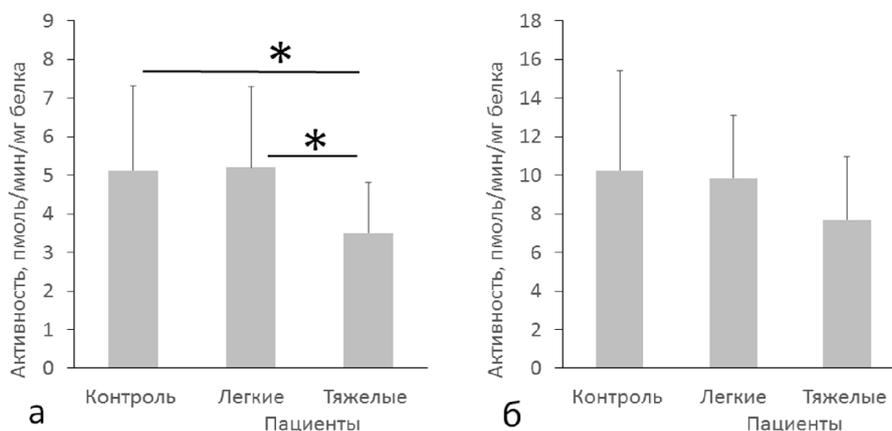


Рисунок 2. Активность протеаз, пмоль/мин/мг белка, в МНК “лёгких” и “тяжёлых” депрессивных пациентов, а также в контрольной группе; а) активность каспазы-8, б) активность каспазы-9. * - $p < 0,05$.

КАСПАЗЫ ПРИ ПОГРАНИЧНЫХ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВАХ

Результаты определения активностей каспаз-2 и -3 у этих пациентов представлены на рисунке 3, а активностей каспаз-8 и -9 представлены на рисунке 4. Закономерность прослеживалась для всех исследованных ферментов: достоверное повышение активности на 17-23% в группе “тяжёлых” пациентов относительно контрольной группы. Группа “лёгких” пациентов от контроля не отличалась. Таким образом, у тревожных пациентов активность каспаз связана только с тяжестью проявления тревоги, но не с депрессией. И, как в случае депрессивных пациентов, у тревожных пациентов активность каспаз в МНК может служить дифференциальным маркером, а именно, на начальных стадиях тревожного расстройства активность каспаз остаётся на контрольном уровне, а затем, по мере развития заболевания, повышается.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе впервые показано увеличение активности каспаз в МНК пациентов с тяжёлой формой тревожности и снижение активности каспаз в МНК пациентов с тяжелой формой депрессии. При лёгких формах этих расстройств отличий

от контроля не обнаружено. Таким образом, для тревоги и для депрессии активность каспаз в МНК может служить дифференциальным маркером состояния, так как на поздних этапах развития патологии у тревожных пациентов активность каспаз повышается, а у депрессивных понижается.

В наше исследование вошли только те пациенты, у которых можно было четко выделить основной синдром – тревогу или депрессию. Однако часто случается, что у пациента выражены симптом тревоги и депрессии, и, по нашим данным (ср. рис. 1 и рис. 3, а также рис. 2 и рис. 4), в этом случае возможно одновременные активация и ингибирование каспаз в МНК. Тем более важно будет продолжить наше исследование и установить, какие механизмы активируют и подавляют каспазы в МНК пациентов при пограничных расстройствах разной степени тяжести. Также одним из направлений дальнейших исследований остается поиск маркеров ППР; в качестве маркеров-кандидатов тяжести состояния пациентов могут быть исследованы активность каспаз или изменение уровней определенных продуктов каспазозависимого протеолиза в клетках крови.

Выполнено при финансовой поддержке РФФ, грант № 14-25-00136.

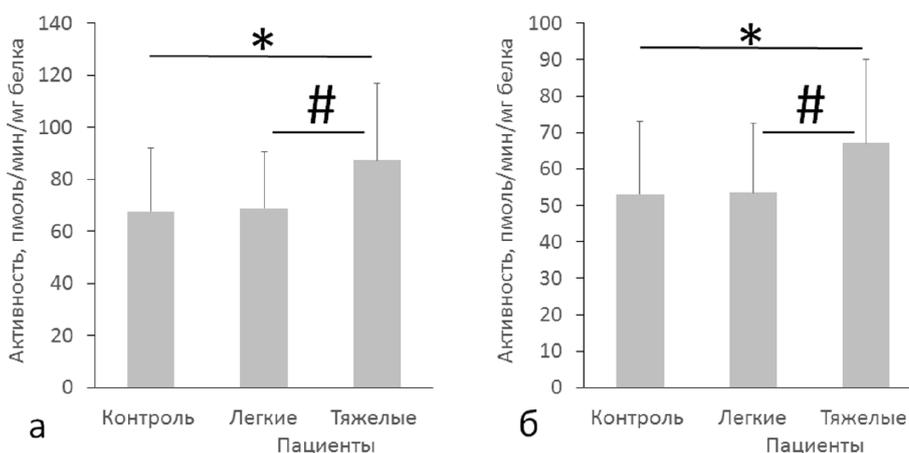


Рисунок 3. Активность протеаз, пмоль/мин/мг белка, в МНК “лёгких” и “тяжёлых” тревожных пациентов, а также в контрольной группе; а) активность каспазы-2, б) активность каспазы-3. * - $p < 0,05$, # - $p < 0,1$.

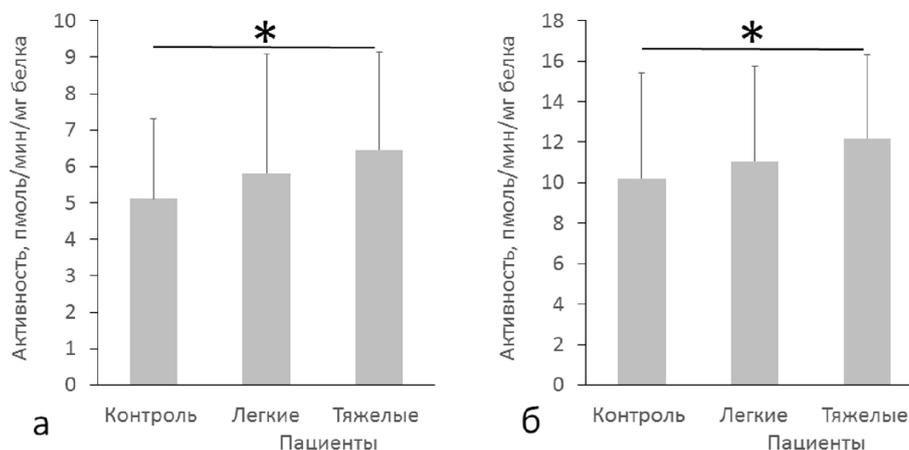


Рисунок 4. Активность протеаз, пмоль/мин/мг белка, в МНК “лёгких” и “тяжёлых” тревожных пациентов, а также в контрольной группе; а) активность каспазы-8, б) активность каспазы-9. * - $p < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александровский Ю.А. (2014) в: Пограничные психические расстройства: фундаментальные, клинические и социальные аспекты (Гусев Е.И., Гехт А.Б., Аведисова А.С., Гуляева Н.В., ред.) ФЦОЗ, Москва, с. 23-43.
2. Wray N.R., Pergadia M.L., Blackwood D.H.R., Penninx B.W.J.H., Gordon S.D., Nyholt D.R. et al. (2012) Mol. Psychiatry, **17**, 36-48.
3. Raison C.L., Capuron L., Miller A.H. (2006) Trends Immunology, **27**, 24-31.
4. Яковлев А.А. (2015) Нейрохимия, **32**, 1-4.
5. Gladkevich A., Kauffman H.F., Korf J. (2004) Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, **28**, 559-576.
6. Bei E., Salpeas V., Pappa D., Anagnostara C., Alevizos V., Moutsatsou P. (2009) Psychoneuroendocrinology, **34**, 1162-1175.
7. Szuster-Ciesielska A., Slotwinska M., Stachura A., Marmurowska-Michalowska H., Dubas-Slomp H., Bojarska-Junak A. et al. (2008) Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, **32**, 686-694.
8. Герасимович Е.С., Яковлев А.А., Дружкова Т.А., Гришкина М.Н., Гехт А.Б., Гуляева Н.В. (2016) Биомед. химия, **62**, 89-92.

Поступила: 20. 04. 2016.
Принята к печати: 07. 09. 2016.

CASPASE ACTIVITY IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS (PBMC) OF PATIENTS WITH DEPRESSION AND ANXIETY OF DIFFERENT SEVERITY

A.A. Yakovlev^{1,2}, T.A. Druzhkova², M.N. Grishkina², A.B. Guekht^{2,3}, N.V. Gulyaeva^{1,2}

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 5A Butlerova str., Moscow, 117485 Russia; e-mail:al_yakovlev@rambler.ru

²Moscow Research & Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow Healthcare Department, 43 Donskaya str., Moscow, 115419 Russia

³Russian National Research Medical University, 1 Ostrovitianova str., Moscow, 117997 Russia

Though borderline psychiatric disorders (BPD) are quite common diseases, their pathogenesis remains obscure. Data from several groups and our previous results suggest that the pathological changes are typical not only for brain cells, but also for cells of the immune system. One of the evident illustrations of immune and nervous systems relationship in pathogenesis of mental diseases is the death of PBMC occurring in patients with depression. We have shown previously that activities of the caspases increase in some types of BPD. In this study, we have investigated caspase activities in PBMC of patients with BPD of different severity. It has been found that in severe depressive disorder activities of caspases were reduced either as compared to healthy controls or to patients with depression lesser severity. In contrast, in patients with severe anxiety activities of caspases were higher than in both control and patients with less severe forms of anxiety disorders. Thus, the study of caspase activity in PBMC makes it possible to differentiate between severe and mild forms of BPD.

Key words: depression, anxiety, PBMC, apoptosis, caspases, borderline personality disorders